

Natália Locks Ferreira

**ESTRATÉGIAS DE FERTILIZAÇÃO E MANIPULAÇÃO
MICROBIANA NO CULTIVO SUPERINTENSIVO DE
CAMARÃO MARINHO EM SISTEMA DE BIOFLOCOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção de grau de mestre em
Aquicultura

Orientador: José Luiz Pedreira Mouriño

Florianópolis,
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Natália Locks

Estratégias de fertilização e manipulação
microbiana no cultivo superintensivo de camarão
marinho em sistema de bioflocos / Natália Locks
Ferreira ; orientador, José Luiz Pedreira Mouriño,
2017.

94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Bioflocos. 3. Fertilização
orgânica. 4. Leveduras marinhas. 5. Litopenaeus
vannamei. I. Mouriño, José Luiz Pedreira. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Estratégias de fertilização e manipulação microbiana no cultivo
superintensivo de camarão marinho em sistema de bioflocos**

Por

NATÁLIA LOCKS FERREIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

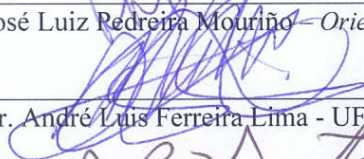


Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

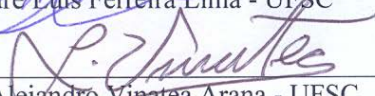
Banca Examinadora:



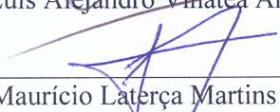
Dr. José Luiz Pedreira Mourão - *Orientador*



Dr. André Luis Ferreira Lima - UFSC



Dr. Luis Alejandro Vinaterra Arana - UFSC



Maurício Laterça Martins - UFSC

Este trabalho é dedicado a minha
família: meus pais, Maria Lúcia e
Paulo Prego e meu irmão, Gedeão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e saúde para realização deste trabalho.

À minha família, sobretudo meus pais, que sempre me mostraram o valor da educação e me proporcionaram todas as condições materiais e afetivas para o pleno desenvolvimento das minhas potencialidades.

Aos professores, servidores e alunos do programa de Pós-Graduação em Aquicultura/UFSC. Em especial minha colega nos laboratórios AQUOS e LCM, Tamiris Henrique, cujo companheirismo dedicação foram determinantes para o sucesso desta empreitada.

Ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk e Sérgio L. A. Junior pela identificação molecular da cepa de levedura isolada.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño, por sua confiança e incentivo desde o início das minhas atividades nos laboratórios da UFSC.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida durante os dois anos de mestrado.

A todos aqueles que não foram citados, mas ajudaram de alguma forma, meu muito obrigada!

“Muitos homens iniciaram uma nova era na sua vida a partir da leitura de um livro.”

Henry David Thoreau

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atuação da levedura marinha *Meyerozyma guilliermondii* sob os parâmetros de qualidade de água, microbiológicos e zootécnicos de *Litopenaeus vannamei* quando adicionada na água de cultivo do camarão cultivado em sistema sem renovação de água, mediante diferentes estratégias de fertilização para formação do sistema de bioflocos. A cepa de levedura foi isolada do solo do estuário da Lagoa da Conceição e foi avaliada *in vitro* quanto à cinética de crescimento em diferentes salinidades e quanto à capacidade de inibição de patógenos. Nos testes *in vitro* levedura não apresentou características inibitórias frente ao patógeno *Vibrio alginolyticus* e tolerou os diferentes níveis de salinidade. Já no ensaio *in vivo* a levedura foi adicionada na água de cultivo na concentração de $1,0 \times 10^4$ UFC·mL⁻¹ semanalmente para avaliar a manutenção e formação de flocos microbianos no cultivo de pós-larvas e estimar o seu efeito sobre o desempenho zootécnico de *L. vannamei* durante 30 dias. Para o ensaio *in vivo* a levedura foi suplementada na água de cultivo do camarão marinho cultivado sob diferentes sistemas de fertilização com reutilização parcial de água de bioflocos maduro e fertilização orgânica da água anterior ao povoamento para formação do sistema de bioflocos. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na interação tempo e sistemas de fertilização nos parâmetros de qualidade de água (amônia, nitrito, SST, SSV e SSed) e no ganho de peso semanal, bem como no direcionamento microbiano na concentração de sólidos e na sobrevivência. Os grupos tratados com *M. guilliermondii* apresentaram menor concentração de sólidos na água de cultivo ao final do período experimental e maior sobrevivência, com isso, conclui-se que a levedura *M. guilliermondii* pode ser aplicada no cultivo superintensivo de camarão sem renovação de água, apresentando efeitos imediatos na redução de sólidos gerados no sistema e na sobrevivência de *L. vannamei*.

Palavras-chave: Aquicultura. Bioflocos. Fertilização orgânica. Leveduras marinhas. *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the performance of the marine yeast *Meyerozyma guilliermondii* on the water quality, microbiological and zootechnical parameters of *Litopenaeus vannamei* when added in the culture water of shrimp cultivated in zero exchange system using different fertilization strategies to form biofloc system. The yeast strain was isolated from the soil of the Lagoa da Conceição estuary and was evaluated *in vitro* regarding its growth kinetics at different salinities and the ability to inhibit pathogens. In the *in vitro* assay *M. guilliermondii* did not present inhibitory characteristics against the pathogen *Vibrio alginolyticus* and tolerated the different levels of salinity. In the *in vivo* tests, the yeast was added in the culture water at the concentration of 1.0×10^4 CFU·mL⁻¹ weekly to evaluate the maintenance and formation of microbial flakes in post-larvae culture and to estimate its effect on the zootechnical performance of *L. vannamei* for 30 days. Therefore the yeast was supplemented in the culture water of marine shrimp grown under different fertilization systems, partial reuse of mature biofloc water and organic fertilization of the water prior to the stand for formation of the biofloc system. Weekly weight gain and water quality parameters (ammonia, nitrite, TSS, VSS and SS) have presented significant difference ($p < 0.05$) in the interaction time and fertilization system as well as microbial targeting in solids concentration and survival. The groups treated with *M. guilliermondii* showed lower solids concentration at the end of the experimental period and higher survival rate. Therewith, concluding that the yeast *M. guilliermondii* can be applied in superintensive shrimp cultivation without water renewal, presenting immediate effects on the reduction of solids generated in the system and on the survival of *L. vannamei*.

Keywords: Aquaculture. Biofloc. Organic fertilization. Marine yeasts. *Litopenaeus vannamei*

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Sequências parciais de DNA da região 5,8S obtidas e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados Genbank..... 62
- Fig. 2.** Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial da região D1/D2 obtida e comparadas com as sequências de organismos representados na base de dados Genbank. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos de importância para biorremediação na aquicultura.....	33
Tabela 2 - Velocidade de crescimento e tempo de duplicação da levedura <i>M. guilliermondii</i> em caldo Sabourud acrescido de 0%, 1%, 2% e 3% de NaCl.....	63
Tabela 3 - Concentração de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos sedimentáveis (SSed) nos tratamentos Reutilização com levedura (RL), Reutilização (R), Fertilização com levedura (FL) e Fertilização (F) durante o cultivo de <i>L. vannamei</i> em sistema de bioflocos	68
Tabela 4 - Desempenho zootécnico do camarão branco do Pacífico cultivado em sistema de bioflocos sem renovação de água com quatro tratamentos, Reutilização com levedura (RL), Reutilização (R), Fertilização com levedura (FL) e Fertilização (F).	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 AQUICULTURA	21
1.2 CARCINICULTURA	22
1.3 SISTEMAS DE CULTIVO	23
1.4 CULTIVO DE CAMARÃO EM SISTEMA DE BIOFLOCOS	24
1.5 RELAÇÃO C/N PARA DESENVOLVIMENTO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS	26
1.6 COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE NO CULTIVO BFT	28
1.7 MANIPULAÇÃO MICROBIANA	31
1.8 LEVEDURAS	34
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 FORMATAÇÃO DO ARTIGO	43
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> Associada à Estratégias De Fertilização No Cultivo De <i>Litopenaeus vannamei</i> em Sistema de Bioflocos; Contribui com a Redução de Material Orgânico	45
Resumo	47
Abstract	49
1 Introdução	51
2 Material e Métodos	54
2.1 Análises <i>in vitro</i>	55
2.1.1 Isolamento de levedura marinha	55
2.1.2 Cinética de crescimento em diferentes salinidades	55
2.1.3 Inibição de patógenos <i>in vitro</i>	56
2.1.4 Identificação da cepa de levedura isolada	57
2.2 Formação de flocos microbianos e adição de <i>M. guilliermondii</i> na água de cultivo de <i>L. vannamei</i>	58
2.2.1 Preparo do inóculo	58
2.2.2 Material Biológico	58
2.2.3 Delineamento experimental	58
2.2.4 Parâmetros físicos e químicos de qualidade de água	60
2.2.5 Parâmetros microbiológicos	60
2.2.6 Desempenho zootécnico	60
2.2.7 Análise estatística	61
3. Resultados e Discussão	61
3.1 Identificação molecular	61

3.2 Cinética de crescimento em diferentes salinidades	62
3.3 Inibição de patógenos <i>in vitro</i>	64
3.4 Formação de flocos microbianos e adição de <i>M. guilliermondii</i> na água de cultivo de <i>L. vannamei</i>	64
3.4.1 Parâmetros de qualidade de água	64
3.4.2 Parâmetros microbiológicos	68
3.4.3 Desempenho zootécnico	69
5 Conclusão	70
Referências	71
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	79
ANEXO A – Resultado da identificação molecular da levedura <i>M. guilliermondii</i>	91
APÊNDICE – A	93

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 AQUICULTURA

A aquicultura é definida como o “cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos, anfíbios e plantas aquáticas” (BARDACH; RYTHER; MCLARNEY, 1972), e atualmente representa a atividade de maior crescimento entre os setores de produção animal (FAO, 2014).

O panorama atual da aquicultura tem se mostrado extremamente favorável à sua expansão mundial, crescendo a uma taxa anual de 8,3% desde 1970 (FAO-FISHSTAT, 2015). Um marco foi alcançado em 2014, quando a contribuição do setor no fornecimento global de pescado para consumo humano ultrapassou pela primeira vez a captura proveniente da pesca extrativista (FAO, 2016). Estimativas preliminares apontam um maior crescimento da produção aquícola uma vez que, capturas provenientes da pesca estão estagnadas frente à demanda de uma classe média emergente global, que aumenta substancialmente (FAO, 2016).

Com a estagnação das capturas provenientes da pesca desde o final da década 80, a aquicultura tem sido responsável pelo impressionante crescimento da oferta de peixe para consumo humano, aumentando a porcentagem de fornecimento global de 7 % em 1974 para 39% em 2004 (FAO, 2016).

O desenvolvimento da aquicultura no mundo é impulsionado em resposta à necessidade da melhoria na segurança alimentar e ao consumo. Consumo este que tinha uma média de 9,9 kg na década de 60, passou para 19,7 kg em 2013 e que apresenta perspectivas futuras de alcançar mais de 20 kg em 2014 e 2015. Uma vez que é uma importante fonte de oferta de pescado mundial, contribuindo com mais de 20% das fontes de proteína animal (FAO, 2016).

Em 2014, a produção da aquicultura totalizou 73,8 milhões de toneladas, sendo 49,8 milhões de toneladas de peixes, 16,1 milhões de toneladas de moluscos, 6,9 milhões de toneladas de crustáceos e 7,3 milhões de toneladas de outros animais aquáticos, incluindo anfíbios (FAO, 2016). Dentre os quais a produção de camarão (carcinicultura) representa uma das maiores rendas gerada para a economia mundial (FAO, 2016).

1.2 CARCINICULTURA

A carcinicultura marinha teve início no Sudoeste Asiático com o cultivo do camarão marinho *Masupenaeus japonicus* na década de 1930 (TREECE, 2000; LUCHESE, 2003). No Brasil, a produção de camarão marinho teve início na década de 1970 com a produção de *Masupenaeus japonicus*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *F. subtilis* e *F. paulensis* (SANTOS, 2009). No entanto, somente em 1990, a indústria brasileira começou a ter representatividade no cenário mundial (CARVALHO, 2011) com a espécie exótica *Litopenaeus vannamei*.

O camarão marinho, *L.vannamei*, é originário do Oeste da América no oceano Pacífico e foi introduzido no Brasil em 1980, demonstrando rusticidade, ampla faixa de tolerância a salinidade e capacidade em aproveitar dietas com níveis protéicos variando de 20% a 40% (COSTA; SAMPAIO, 2004).

Na carcinicultura nacional o camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*, representa 99,8% da produção nacional de crustáceos (FAO, 2012). Características como capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo, altas taxas de crescimento e sobrevivência, boa produtividade e grande aceitação no mercado, transformaram o *L. vannamei* na única espécie cultivada comercialmente no país (FAO, 2012).

O auge da produção nacional para a espécie se deu em 2003, atingindo 90.190 toneladas (FAO, 2012). Entretanto, mesmo com o bom cenário produtivo, a partir de 2004 a carcinicultura enfrentou problemas sanitários cujo impacto negativo prejudicou seu desempenho, com destaque para o Vírus da Mancha Branca (do inglês *White Spot Syndrome Virus* - WSSV) e o Vírus da Mionecrose Infeciosa (do inglês *Infectious Myonecrosis Virus* - IMNV), que reduziu a produção para atuais 65.000 toneladas (FAO, 2014; FAO-FISHSTAT, 2015). Atualmente a Síndrome da Necrose Hepatopancreática Aguda (do inglês *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* - AHPND), causada por vibrio, é a mais nova enfermidade enfrentada pelo setor (JOSHI et al., 2014).

Uma das portas de entrada de enfermidades nos sistemas de cultivo é através da renovação de água dos viveiros, onde não há controle de entrada bacteriana (PÁEZ-OSUNA, 2001).

Razão pela qual a renovação de água preventiva com enfoque em qualidade de água tem sido a estratégia mais utilizada nas fazendas de camarão, no entanto, essa prática traz riscos, tanto para os cultivos

quanto para o ambiente adjacente, pois, a água bombeada para o sistema possa servir como vetor de doenças (LIGHTNER, 2005); e a água descartada do cultivo, além de poluir o ambiente costeiro (PÁEZ-OSUNA, 2001) pode ser uma fonte de contaminação biológica (HOROWITZ; HOROWITZ, 2002).

Diante das perdas econômicas enfrentadas pela carcinicultura mundial causadas pelo surto de doenças e em virtude das críticas quanto à sustentabilidade da atividade, se faz necessária a adoção de práticas de produção que reduzam os impactos ambientais e o desenvolvimento de novos modelos de cultivo que assegurem a sustentabilidade e que possibilitem maior biosseguridade com o uso racional da água (HARGREAVES, 2006; STENTIFORD, 2012). Nessa perspectiva, o sistema de cultivo em bioflocos tem sido apontado como uma alternativa viável aos sistemas tradicionais, ocupando menor área de cultivo, utilizando menor volume de água e com maior biosseguridade frente às enfermidades virais (HARGREAVES, 2006; MOSS et al., 2012).

1.3 SISTEMAS DE CULTIVO

Atualmente os sistemas de cultivo empregados na carcinicultura são categorizados conforme o aporte de nutrientes, densidade de estocagem e pela frequência de renovação de água (POERSCH et al., 2006; SOBRINHO, 2011). Poersch et al., (2006) indicam que quanto maior a densidade de camarões por área cultivada, maior a quantidade de alimento e a renovação de água.

Poli et al. (2004), classificam os sistemas de produção em aquicultura da seguinte maneira: a) Extensivo - o crescimento da espécie cultivada é totalmente dependente da produtividade natural do viveiro, apresenta taxas de renovação de água diária de 2 a 5%, densidade de estocagem de 0,5 a 4 camarões/m³ e produtividade de 200 a 700 kg/ha/ano; b) Semi-intensivo - permitem maior densidade de estocagem, com 6 a 20 camarões/m³, a partir da combinação de alimento natural e artificial, utilizam o aporte de fertilizantes, maior renovação diária de água, de 5 a 20 % do volume total, e apresenta produtividade superior a 10t/ha/ano; e c) Intensivo – caracterizado por elevada densidade de estocagem, pela dependência total de alimento artificial e aeração contínua (TACON; PHILLIPS; BARG, 1995).

Segundo Tacon (1996) a produtividade no sistema intensivo pode variar de 15 a 100t/ha/ano, dependendo do grau de intensificação com relação à qualidade da dieta, aeração, recirculação e renovação de água.

Essa técnica se baseia no desenvolvimento de comunidades heterotróficas e na formação de bioflocos, onde a relação Carbono e Nitrogênio (C:N) é monitorada afim de manter a proporção 10:1, favorecendo o desenvolvimento bacteriano. Tanto o sistema intensivo quanto o superintensivo caracterizam-se pelo baixo impacto ambiental, pela biosseguridade e sustentabilidade (FAO, 2014).

1.4 CULTIVO DE CAMARÃO EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

Apontado como alternativa ao sistema intensivo tradicional, o cultivo heterotrófico é considerado o mais vantajoso em termos econômicos e sociais, devido a sua maior rentabilidade por área e maior necessidade de mão-de-obra (EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZON, 2013). Além de apresentar baixíssimo impacto ambiental quando comparado a outros modelos de cultivo (MORIARTY; DECAMP; LAVENS, 2005).

O cultivo de camarão em sistema de bioflocos comporta alta densidade de estocagem e elevada produtividade, utilizando pequenas áreas de terra e mínima ou nenhuma renovação de água (KRUMMENAUER et al., 2011), atingindo níveis de produção de 12 kg de camarões por m³ de água em unidades de produção de até 280 m² (SAMOCHA et al., 2010).

O aumento da densidade de estocagem atrelado à renovação mínima de água acarreta no acúmulo de resíduos de ração, excretas e compostos inorgânicos tóxicos aos organismos cultivados (BURFORD et al., 2003; VAN WYK, 2006). Tal acúmulo ocorre porque o camarão retém uma pequena porcentagem dos nutrientes presentes na ração (JACKSON et al., 2003) e, como as quantidades de ração utilizadas nos cultivos intensivos são elevadas, parte do resíduo gerado fica acumulado. Embora os camarões tolerem certos níveis de intensificação, o aumento da biomassa nos sistemas intensivos compromete a qualidade de água (AVNIMELECH, 2006; AVNIMELECH, 2007).

Nos sistemas com mínima ou zero renovação de água o controle da qualidade da água pode ser feito através da reciclagem por filtros biológicos ou através do tratamento da água no próprio tanque, por meio de comunidades microbianas que se desenvolvem naturalmente na coluna d'água (CRAB et al., 2007).

Em sistemas de baixa intensidade de produção o mecanismo de controle dos compostos nitrogenados inorgânicos é através da fotossíntese (BRUNE et al., 2003). Porém, à medida que se intensificam os cultivos esse mecanismo não é capaz de controlar o nitrogênio

inorgânico (AVNIMELECH, 2011). Assim, torna-se necessário a manipulação adequada da biomassa microbiana para o efetivo controle da qualidade de água. Tal estratégia é baseada no estabelecimento de uma relação carbono/nitrogênio que facilita o crescimento de microrganismos heterotróficos para incorporação do nitrogênio amoniacal presente no meio (MORIARTY, 1997; AVNIMELECH, 1999; EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006; SAMOCHA, et al., 2007). Esta relação é obtida utilizando-se fontes de carbono orgânico (melaço, farinhas, açúcar, dextrose, etc.) considerando que 20 g de carboidrato ou 5,7 g de carbono são necessárias para conversão de 1 g de nitrogênio amoniacal em biomassa microbiana (AVNIMELECH, 1999; EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006).

Embora seja preferencial a assimilação direta dos compostos nitrogenados em proteína microbiana (HARGREAVES, 2006), tem sido verificada a ocorrência do processo de nitrificação em sistemas fechados e com elevada relação C/N (NOOTONG; PAVASANT; POWTONGSOOK, 2011). Isso demonstra a possibilidade de mais de uma via de remoção do nitrogênio inorgânico e que estas se sobrepõem em algum momento do cultivo (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006). Segundo Hargreaves (2006) num segundo momento, o sistema promove o estabelecimento de uma microbiota nitrificante que pode participar em maior ou menor grau no controle dos compostos nitrogenados.

De acordo com Ebeling, Timmons e Bisogni (2006) o que parece ocorrer nos sistemas de cultivo é uma mistura de vias de remoção, sendo simultâneas as ocorrências. Os mesmos autores citam ainda que nos sistemas de bioflocos, microrganismos quimioautotróficos e heterotróficos, se destacam na remoção do nitrogênio. Moriarty (1997) aponta que o dióxido de carbono (CO_2), produto final do metabolismo heterotrófico, serve como fonte de carbono para o crescimento da biomassa microbiana autotrófica, que eventualmente pode ser consumida pela comunidade heterotrófica, evidenciando assim uma relação de complementaridade. Apesar dessa relação de complementaridade, Hargreaves (2006) cita que cronologicamente o estabelecimento da comunidade heterotrófica ocorre mais rapidamente, a uma taxa de crescimento 10 vezes maior por unidade de substrato, em relação às nitrificantes. Rios da Silva (2009) observou que no cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos microrganismos nitrificantes apresentam maior eficiência na remoção do nitrogênio, porém, metabolizam mais demoradamente a amônia, devido à lenta taxa de crescimento.

Assim, se os microrganismos heterotróficos não estiverem presentes nas fases iniciais do cultivo pode ocorrer um aumento nas concentrações de amônia, haja vista que a comunidade autotrófica possui crescimento mais lento do que a heterotrófica e a tendência é haver um acúmulo inicial deste composto. Se a via autotrófica chegar a dominar o sistema, a amônia pode ser oxidada a nitrito pelas bactérias Amônia-Oxidantes - AOB, que em sua maioria pertencem aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*. Porém, as bactérias Nitrito-Oxidantes - NOB, dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*, que oxidam o nitrito a nitrato e possuem um crescimento mais demorado do que as AOB, acarretando no acúmulo ainda maior de nitrito no sistema (AVNIMELECH, 2009).

Ciente dos danos causados pelos compostos nitrogenados no cultivo, técnicas de manejo têm sido estudadas e adotadas para o melhor funcionamento do sistema, como a relação C/N ideal para o desenvolvimento das comunidades microbianas (AZIM; LITTLE; BRON, 2008), a reutilização de água de um cultivo anterior (KRUMMENAUER et al., 2012) e a caracterização das comunidades microbianas presentes nos cultivos *Biofloc Technology System* – BFT (RAY et al., 2010).

1.5 RELAÇÃO C/N PARA DESENVOLVIMENTO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

A fertilização da água de cultivo antes da estocagem é uma prática comum no cultivo de vários organismos aquáticos (MISCHKE; ZIMBA, 2004). Diversos autores relatam que os nutrientes presentes nos fertilizantes são incorporados e reciclados pela biomassa microbiana, estabelecendo um ambiente rico em alimento natural, que servem de alimento para camarões (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006; ZHOU et al., 2009). Nos sistemas de cultivo a fauna e flora bentônica representam a principal fonte alimentar de camarões, reduzindo a necessidade de ração (NUNES; PARSONS, 2000).

Segundo Avnimelech (1999) a manipulação da relação carbono/nitrogênio (C/N) por meio da adição de substratos ricos em carbono orgânico melhora a produção e a retenção de nutrientes nos sistemas de cultivo de camarão; e tem sido amplamente utilizada como indicador da taxa de decomposição da matéria orgânica (ALEXANDER, 1961). Se a matéria orgânica apresentar baixo teor de nitrogênio (elevada relação C/N), este elemento necessário para crescimento microbiano, será obtido a partir da coluna d'água e incorporado em

proteína microbiana (BOYD, 1996). Fenômeno esse que é utilizado na imobilização de nitrogênio inorgânico na tecnologia de bioflocos (BFT), através da fertilização orgânica e do ajuste da relação C/N na ração (AVNIMELECH; MOKADY; SCHORODER, 1989; AVNIMELECH, 1999).

Segundo Hargreaves (2006) a limitação de nitrogênio para o crescimento microbiano pode ser promovida através do fornecimento de substratos com relação C/N 10:1 ou maiores; considerando que os microrganismos requerem cerca de 20 unidades de carbono por unidade de nitrogênio assimilado (AVNIMELECH, 1999). Portanto, se a razão C/N é aumentada pela adição de carboidratos, em associação com ração, há maior disponibilidade de carbono permitindo que a comunidade microbiana heterotrófica cresça em abundância (ASADUZZAMAN et al., 2010). Estudos comprovam que as relações C/N de 20:1 e 30:1 suportam comunidades microbiológicas mais úteis e eficientes no tratamento da água (BOOPATHY; FONTENOT; KILGEN; 2005). Avnimelech (1999) relata que a relação C/N ideal é de 15, 25:1.

A manipulação na relação C/N resulta na mudança de um sistema autotrófico para um sistema heterotrófico (AVNIMELECH, 1999). Del Giorgio (1997) aponta que essa mudança ocorre quando a quantidade de carbono de origem alóctone ultrapassa a quantidade de carbono fornecida pelo fitoplâncton para suportar o crescimento microbiano. O aumento das relações C/N favorece a dominância da comunidade heterotrófica no sistema e a assimilação dos compostos nitrogenados para produção de proteína microbiana (AVNIMELECH, 1999; BURFORD; LORENZEN, 2004; KENT; BROWDY; LEFFLER, 2011).

Dentre as diferentes práticas de fertilização é possível usar carboidratos ricos em carbono orgânico somente durante as primeiras semanas de cultivo, a fim de reduzir as concentrações de nitrogênio amoniacal até o estabelecimento da microbiota nitrificante (SAMOCHA et al., 2007; RAY; LOTZ, 2014). Em seguida, a entrada de carbono orgânico pode ser reduzida e o nitrogênio amoniacal pode ser convertido em nitrato pelos microrganismos nitrificantes, o qual é um composto menos tóxico (COHEN et al., 2005). Ray et al. (2011) apontam o uso contínuo de fontes de carbono durante todo o cultivo como outra prática de fertilização. Neste caso o sistema reduz os compostos nitrogenados tóxicos favorecendo a produção de alimento natural, que na forma de material floculado (bioflocos), serve de alimento diretamente para o camarão (GAO et al., 2012). Além disso, cultivos constantemente enriquecidos com uma fonte de carbono orgânico resultam em efluentes menos concentrado (RAY; LOTZ, 2014). Hari et al. (2006) relatam que

a adição de carboidratos em combinação com a diminuição do nível de proteína na dieta melhorou a sustentabilidade do cultivo de camarão em sistema extensivo.

A adição de diversas fontes de carbono na água para estimular o crescimento de microrganismos heterotróficos em viveiros de camarão tem sido demonstrada por diversos autores (AVNIMELECH, 1999; BURFORD et al., 2003; HARI et al., 2004).

Segundo McIntosh et al. (2000), a comunidade microbiana pode demorar até seis semanas para se desenvolver adequadamente em um ciclo de cultivo. Samocha et al. (2012), demonstraram que a aplicação de melaço na água de cultivo em sistema superintensivo sem renovação de água reduz o tempo necessário para o desenvolvimento dos bioflocos de sete para cinco semanas. Outros pesquisadores sugerem o uso de água de bioflocos de um ciclo de produção anterior para acelerar a formação da comunidade microbiana em sistemas recém-iniciados (KRUMMENAUER et al., 2011; McABEE et al., 2003). Segundo Krummenauer et al. (2012) uma vantagem que o sistema de bioflocos apresenta é a possibilidade de utilização da água por diversos ciclos de cultivo.

A reutilização de água é uma técnica que tem se mostrado eficiente na manutenção dos níveis dos compostos nitrogenados abaixo das concentrações que afetam a espécie em cultivo. Podendo estabilizar as comunidades microbianas e os parâmetros de qualidade de água mais rapidamente, encurtando o período de cultivo e minimizando possíveis problemas com os compostos nitrogenados, assim como reduz os custos com bombeamento de água, diminui os insumos e o tratamento de efluentes nos sistemas de cultivo, além de possibilitar a reciclagem dos nutrientes presentes na coluna d'água (SAMOCHA et al., 2010). Segundo Krummenauer et al. (2011), o reuso de 2,5% de água de um cultivo anterior acelera a formação dos agregados microbianos e contribui para a manutenção da qualidade da água.

1.6 COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE NO CULTIVO BFT

Os microrganismos presentes no ambiente de cultivo desempenham papel preponderante na alimentação do camarão. Por se tratarem de animais com hábito alimentar onívoro, os camarões são extremamente dependentes do alimento natural (MORIARTY, 1997). Microrganismos como plânctons, bactérias e algas são de grande importância para os sistemas aquícolas, particularmente com respeito à produtividade primária, ciclagem dos nutrientes, nutrição dos animais

cultivados, qualidade da água, controle de doenças e do impacto dos efluentes ao meio ambiente (MONTROYA; VELASCO, 2000).

Sistemas de cultivo com bioflocos são caracterizados por apresentarem altas concentrações de nutrientes, bactérias, fitoplânctons e protozoários (BURFORD et al., 2003). As comunidades microbianas auxiliam na formação e estruturação dos bioflocos, os quais consistem em uma mistura complexa composta por bactérias, algas, fungos, protozoários, rotíferos, nematóides, detritos orgânicos e inorgânicos (CRAB et al., 2007; SCHRYVER et al., 2008). Os bioflocos são uma importante fonte de nutriente e suplementam a dieta dos camarões (MCINTOSH, 2000; HARGREAVES, 2006; WASIELESKY et al., 2006). Segundo alguns autores o consumo de bioflocos pelo camarão tem sido reportado na melhoria da conversão alimentar, das taxas de crescimento, na resistência a doenças e maior sobrevivência (WASIELESKY et al., 2006). Podendo substituir uma fração significativa da demanda por proteína, conforme reportado por Avnimelech (2009), possibilitando assim a redução nos custos de produção (EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZON, 2013).

Em sistemas fechados a comunidade microbiana sofre alterações em termos de biomassa e de função ao longo do cultivo, desde a estocagem até o final do ciclo de produção (TALLAMY; MOSS, 2006). Alguns estudos demonstram que fatores abióticos, como variações nas taxas de remoção de sólidos, razão C/N da ração, alcalinidade da água, nível de oxigênio e intensidade luminosa podem exercer efeito sobre a comunidade microbiana (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006; HARGREAVES, 2006; VAN WYK, 2006; DE SCHRYVER et al., 2008). Browdy et al. (2001) apontam que sem o manejo de sólidos, a comunidade microbiana no cultivo de camarão em sistemas fechados, tende a mudar de uma comunidade predominante por algas para uma comunidade dominada por microrganismos heterotróficos.

Os microrganismos heterotróficos naturalmente encontrados no sistema podem atuar na diminuição dos compostos nitrogenados presentes, incorporando-os na formação de uma biomassa rica em proteínas, além da mineralização destes resíduos tóxicos (ARANTES, 2007).

O grupo das α , β , e γ -proteobactéria estão relacionados à nitrificação e a desnitrificação, que oxida o nitrato a nitrogênio gasoso. As subclasses β , e γ -, da classe *Proteobacteria*, contém em sua maioria bactérias nitrificantes, com destaque para os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira* (OLIVEIRA et al., 2006). Proteobactérias foram identificadas por Li e colaboradores (2007) com frequência de

24,6%, sendo pertencentes aos gêneros *Shewanella* sp., *Pantoea* sp., *Aranicola* sp., *Pseudomonas* sp. e *Vibrio* sp. Enquanto bactérias Vibrionáceas e outros gêneros bacterianos como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus* e *Shewnella* são normalmente encontradas desempenhando papel importante na manutenção do equilíbrio no cultivo (COSTA, 2006).

O cultivo superintensivo de bioflocos é dotado por uma microbiota diversificada, que incluem bactérias benéficas e neutras, bem como bactérias patogênicas e oportunistas (SCHULZE et al., 2006). Anand et al., (2014) apontam que os principais microrganismos encontrados em sistema de biofloco pertence a bactérias do gênero *Vibrio* sp., *Bacillus* sp. e *Lactobacillus* sp. Também foram observados agregados de matéria orgânica, comunidades de zooplâncton como ciliados e rotíferos e uma pequena quantidade de microalgas autotróficas. De modo semelhante, Ballester et al., (2010) relatam que o biofloco é composto por detritos de matéria floculada colonizado por microrganismos heterotróficos, cianobactérias filamentosas, dinoflagelados, ciliados, flagelados e rotíferos. Arantes (2007) quantificando a comunidade microbiana em sistema heterotrófico encontrou microrganismos heterotróficos e vibrios como sendo a sua maioria, com $1,7 \times 10^7$ UFC·mL⁻¹ e $6,1 \times 10^6$ UFC·mL⁻¹, respectivamente. Ferreira (2015) isolou *B. thuringiensis*, *B. licheniformis* e *B. licheniformis* do cultivo superintensivo de *L. vannamei* com flocos microbianos e *B. cereus* do decantador de sólidos.

No cultivo do camarão marinho o equilíbrio ecológico entre bactérias patogênicas pode ser alterado por práticas de manejo inadequadas, levando a proliferação das mesmas (KARUNASAGAR et al., 1994). Dentre as bactérias oportunistas no cultivo de bioflocos, se destacam as bactérias marinhas do gênero *Vibrio* (SONG; LEE, 1983). Diversas espécies de *Vibrio* já foram reportadas como patogênica ao camarão. Recentemente o *Vibrio parahaemolyticus*, conhecido como Síndrome de Mortalidade Precoce – SEM, ou Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda - AHPND, tem causado mortalidade nos sistemas de cultivo de *L. vannamei* (LEAÑO; MOHAN, 2012).

Na aquicultura, o controle de enfermidades ocorre por intermédio de antibióticos. Contudo, o uso indiscriminado resulta na seleção de bactérias resistentes, na disseminação de genes de resistência entre bactérias patogênicas/comensais e no impacto ambiental (contaminação de água e sedimentos) (NEWAJ-FYZULETAL; AL-HARBI; ANDAUSTIN, 2014).

Como alternativa ao uso de quimioterápicos, a bioaumentação (do inglês - *Bioaugmentation*) vem ganhando espaço como uma estratégia de manejo para prevenir o surto de enfermidades e manter a qualidade de água no cultivo de organismos aquáticos (JANEO; CORRE; SAKATA, 2009).

1.7 MANIPULAÇÃO MICROBIANA

A bioaumentação é uma técnica de biorremediação que consiste na inclusão de microrganismos no ambiente aquático visando acelerar a remoção e a biodegradação de um contaminante indesejável. Podendo a comunidade microbiana ser de origem autóctone, alóctone ou geneticamente modificada e tem se tornado uma prática cada vez mais comum na aquicultura (JIAO et al., 2011).

No entanto, um ponto importante para o entendimento da atuação dos microrganismos é a relação destes com o substrato necessário para seu crescimento e a possibilidade de oxidação e degradação do mesmo. Microrganismos autotróficos são capazes de utilizar moléculas inorgânicas como fonte de energia, via fotossíntese ou quimiossíntese, obtendo energia a partir da luz e por meio de compostos químicos como amônia e nitrito, respectivamente. As bactérias nitrificantes são um exemplo de bactérias quimioautotróficas que utilizam a amônia e o nitrito como fonte de energia e o dióxido de carbono (CO_2) como fonte de carbono inorgânico, dessa forma, essas bactérias podem utilizar a energia liberada no processo de oxidação dos compostos minerais que contêm nitrogênio inorgânico para reduzir o carbono orgânico em dióxido de carbono. Enquanto os microrganismos heterotróficos, como *Bacillus* spp., utilizam compostos orgânicos para obter o carbono, essencial para crescimento e desenvolvimento microbiano (MORIARTY, 1998; JIAO et al., 2011).

O sucesso da bioaumentação no ambiente de cultivo abrange boa taxa de nitrificação e desnitrificação, decomposição de matéria orgânica e absorção de um contaminante específico (MORIARTY, 1998; ZHOU et al., 2009; JIAO et al., 2011), além da melhoria na mineralização do carbono, resultando em menor acúmulo de material orgânico (SHARIFF et al., 2001).

A ação microbiana no sistema aquático promove um ambiente favorável para o crescimento da espécie de cultivo e a supressão do crescimento de patógenos na coluna d'água, como também estimula o crescimento da espécie cultivada através da produção de compostos

bioativos (hormônios, enzimas e vitaminas). Fazem parte destes grupos bactérias e fungos (ZHOU et al., 2009).

Os microrganismos benéficos são atualmente aplicados na aquicultura sob três formas diferentes: cepas singulares, cepas múltiplas e cepas compostas com e sem aditivos. Estes desempenham suas atividades através da regulação da microbiota (atividade microbiana), manutenção da eubiose - aumento do nível de saúde do hospedeiro e promoção de proliferação de microrganismos benéficos e seus metabólitos na micro-ecologia; e através da degradação da matéria orgânica (fezes, restos de alimento, animais mortos) para manutenção da dinâmica ecológica entre os organismos cultivados (ZHOU et al., 2009).

Em aquicultura inúmeros microrganismos têm sido reportados quanto à sua eficiência como agentes biorremediadores (Tabela 1). Sendo as bactérias do gênero *Bacillus* sp. mencionadas por diversos autores reportam como organismos mais comumente utilizados, seguido por *Aeromonas* e *Pseudomonas* (ANTONY; PHILIP, 2006; ZHOU et al., 2009).

Bacillus sp. e *Pseudomonas* sp. também são descritas por Antony e Philips (2006) como as principais espécies utilizadas em produtos comerciais juntamente com bactérias nitrificantes e sulfúreas.

Os produtos comerciais para tratamento biológico para uso em aquicultura são agrupados com base na forma de aplicação e no efeito sobre o cultivo (MORIARTY, 1997; 1998). Conforme esses mesmos autores os produtos de bioaugmentação são compostos por microrganismos e enzimas que aceleram a decomposição de material orgânico e reduzem a quantidade de lodo no sistema de cultivo.

Segundo Wang (2006) os fungos, juntamente com as bactérias, são os principais decompositores de matéria orgânica no ecossistema terrestre e aquático. Gerardi (2015) ressalta que por serem microrganismos saprófitas, os fungos apresentam capacidade e um número diversificado de endoenzimas que lhes permitem hidrolizar e degradar compostos orgânicos que as bactérias não conseguem ou que não são eficazes na degradação. Os principais fungos utilizados na bioaugmentação incluem os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. (GERARDI, 2015).

Tabela 1 - Microrganismos de importância para biorremediação na aquicultura

Microrganismo (bactéria ou fungo)	Foco de pesquisa	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	Nitrificação	Yang et al., 2011
<i>Bacillus subtilis</i>	Nitrificação; degradação do material orgânico	Liu; Han, 2004
<i>B. thuringiensis</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. cereus</i>	Qualidade de água, inibição de patógenos (<i>Vibrios</i>), parâmetros imunológicos e zootécnicos de <i>L. vannamei</i>	Ferreira, 2015
<i>Nitrobacter</i> e <i>Bacillus</i>	Qualidade da água e estabilidade do fitoplâncton no cultivo de <i>P. mondon</i>	Janeo; Corre; Sakata, 2009
<i>Bacilus</i> sp.	Inibição de patógenos (<i>Vibrios</i> spp.)	Rengpipat et al., 1998
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Tratamento de efluentes	Diep et al., 2009
<i>Enterococcus</i>	Inibição de patógenos (<i>Aeromonas</i> e <i>Sphingomous</i>)	Tendência et al., 2004
<i>Aspergillus</i> spp.	Degradação de matéria orgânica	Zhou et al., 2009
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Inibição de patógenos (<i>Aeromons salmonicida</i>)	Gram et al., 2001
<i>Pseudomonas</i> sp.	Inibição de patógenos (<i>Vibrio</i> spp.)	Spanggaard et al., 2001
<i>Fusarium</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Síntese de NO ₂ -O	Castignetti; Gunner, 1981
<i>Actinomycetes</i> ; <i>Aspergillus</i> spp.	Degradação de material orgânico	Zhou et al., 2009
<i>Aeromonas</i>	Inibição de patógenos (<i>Vibrio</i> spp.)	Gibson; Woodworth; George, 1998

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

1.8 LEVEDURAS

As leveduras são microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, unicelulares, eucariontes (LACAZ et al, 2002) e compõem a classe *Saccharomycota* e filo *Ascomycota* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011a, 2011b). Possuem núcleo organizado com membrana nuclear (eucariótica), mas não possuem mecanismos de locomoção (flagelos ou cílios) e são microrganismos aclorofilados não filamentosos e sem corpo de frutificação (LACAZ et al, 2002). As células leveduriformes possuem parede celular rígida e são facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas (MARTINI, 1992).

Encontram-se amplamente distribuídas no ambiente natural, incluindo a flora microbiana do homem, sendo parte da dinâmica biológica e química no solo, no ar, na água, em lagos, rios e mares (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011a, 2011b). No ambiente aquático são encontradas na coluna d'água, no sedimento, em plantas e animais. Atuando na decomposição de substratos, reciclagem de nutrientes, biodegradação de óleos e compostos recalcitrantes (MEYERS; AHEARN, 1974); assim como estão envolvidas ainda nas interações com microrganismos, incluindo simbiose, mutualismo e competição (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012).

As leveduras apresentam dimorfismo sexual, podendo apresentar ambos os estados sexuais. Segundo Goldman (2008) várias espécies são descritas em seu estado anamorfo devido ao desconhecimento do seu modo de reprodução sexual (estado teleomorfo), a uma em virtude da habilidade de formar esporos, a duas pela relação filogenética entre anamorfo e teleomorfo ainda ser desconhecida. Porém, uma vez descoberto o teleomorfo para uma espécie conhecida anteriormente como anamorfo os nomes passam a ser sinônimos (GOLDMAN, 2008). Reproduzem-se sexuadamente por ascósporos e assexuadamente por brotamento, cissiparidade ou a combinação desses dois processos (MADIGAN et al., 2010), sendo o a reprodução por brotamento a mais comum (GOLDMAN, 2008).

São organismos heterotróficos, o que significa que o metabolismo energético e o metabolismo do carbono estão intimamente interligados. A síntese do trifosfato de adenosina – ATP, é provida pela oxidação de moléculas orgânicas, que também atua como fonte de carbono para a biossíntese, sendo finalmente usada como intermediário energético para praticamente todas as atividades celulares (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006).

As leveduras apresentam necessidades nutricionais relativamente simples, as quais compreendem uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio (sal de amônio, nitrato, aminoácidos, peptídeos, uréia, purinas), fosfato, sulfato, concentrações baixas de potássio, magnésio, cálcio, ferro, zinco e, na maioria dos casos uma vitamina, biotina, tiamina ou ácido pantotênico. A principal fonte de carbono empregada pelas leveduras é o carboidrato, essencialmente monossacarídeos (glicose, frutose, galactose ou manose) ou dissacarídeos (maltose ou sucrose) (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012).

O metabolismo e a fisiologia das leveduras são dependentes da disponibilidade de açúcar e oxigênio. A respiração aeróbia foi definida por Dawes (1986) como a oxidação completa de moléculas contendo carbono para CO_2 e H_2O pelos processos inter-relacionados do ciclo do ácido tricarboxílico – TCA, e a cadeia de transporte de elétrons atrelada à fosforilação com o oxigênio como aceptor terminal de elétrons. Sendo que no metabolismo anaeróbio, "fermentação alcoólica", o piruvato, resultado da glicólise, é transformado em etanol e CO_2 num processo redox-neutro (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986).

Diversos autores apontam três efeitos frequentemente observados associados aos processos de geração de energia envolvidos no metabolismo do açúcar e/ou disponibilidade de oxigênio: efeito de Pasteur, Cabtree e Custer (VANDIJEN; SCHEFFERS, 1986).

As leveduras têm sido utilizadas para a fabricação de pão, cerveja e vinho desde os tempos antigos. O papel na fermentação foi reconhecido por Pasteur e as primeiras culturas puras fermentadoras de cerveja e de vinho foram obtidas por Hansen e Muller-Thurgau, respectivamente, no final do século XIX. Desde então, a utilização de leveduras se tornou uma prática padrão na fermentação industrial, não só para alimentos e bebidas, mas também para uma ampla variedade de produtos feitos por leveduras ou a partir de células de leveduras (DEAK, 2006).

Como atributo tradicional, tem-se o papel das leveduras na fermentação de vários produtos como cerveja, cidra, vinho, saquê, bebidas destiladas, pães, queijo, salsicha, entre outros. Diversos processos industriais já consagrados como a produção do bioetanol, rações, enzimas industriais e metabólitos de pequeno peso molecular igualmente envolvem a participação das leveduras. Da mesma forma possuem papel importante na agricultura como agentes de biocontrole, indicadores de qualidade ambiental, além de serem utilizadas em processos de biorremediação, como no tratamento de efluentes e remoção de poluentes (JOHNSON; ERASUN, 2011)

Dentre as aplicações das leveduras na biotecnologia, vem sendo dada atenção ao uso de tais microrganismos na degradação de poluentes e no tratamento de efluentes. A aplicação de leveduras em tais processos foi sugerida pela primeira vez há aproximadamente 18 anos por pesquisadores japoneses, os quais fizeram uso de leveduras para o tratamento de efluente industrial de produção de óleo e obtiveram bons resultados (CHIGUSA et al., 1996). Similarmente também já foram descritas leveduras com capacidade de degradar substâncias como compostos fenólicos (JIANG et al., 2010), corantes (YANG et al., 2003), nitrobenzeno (ZHENG et al., 2009), biodiesel (De LOS et al., 2012), hidrocarbonetos (ZINJARDE; PANT, 2002); e na oxidação do cromo (Cr) (RAJPERT; SKLODOWSKA; MATLAKOWSKA, 2013). Segundo Zinjarde et al., (2014) cepas de *Yarrowia lipolytica*, isolada de solos, água do mar, sedimentos e águas residuais, possuem habilidades fisiológicas para biorremediação ambiental.

Na aquicultura o papel das leveduras tem sido descrito através de produtos comerciais que utilizam em seu conteúdo principalmente bactérias nitrificantes e/ou sulfóforas, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, fungos, como *Aspergillus* sp, leveduras e/ou o mix destes microrganismos (ZHOU et al., 2009). O qual inclui em maior número bactérias ácido-láticas e leveduras (DIVER, 2001), sendo *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* as principais espécies de levedura.

No ambiente aquático, os produtos biorremediadores atuam de várias formas, seja reduzindo substâncias inorgânicas e orgânicas para uso como energia, ou utilizando o acúmulo de matéria orgânica no fundo dos viveiros como fonte de carbono para a produção de biomassa microbiana (ZHOU et al., 2009). Fato esse descrito por Salência (2011) em ensaio utilizando *B. subtilis*, *A. níger* e *S. cerevisiae* (Comambio®) na água de cultivo superintensivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos sem renovação de água, observou o aumento da degradação microbiana de resíduos orgânicos (lodo) e consequentemente maior manutenção dos parâmetros de qualidade da água.

O principal microrganismo de biorremediação com relatos positivos para a carcinicultura é a levedura *S. cerevisiae*. Muitos trabalhos relatam a susceptibilidade da *S. cerevisiae* à salinidade, bem como sua evolução para esta resistência. Na revisão feita por Kutý e Philip (2008), os principais gêneros isolados de ambiente marinho são *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Trichosporon*, onde em 47 trabalhos de isolamento de leveduras

marinhas apenas 4 evidenciaram *S. cerevisiae* de ambiente marinho, 2 em solo, 1 da água e apenas 1 de estuário.

As leveduras de ambiente marinho podem ser obrigatórias ou facultativas, as obrigatórias são originárias de ambiente marinho e o habitam ao longo de suas vidas, enquanto as leveduras marinhas facultativas são originárias de outros ambientes, como rios, solos, madeiras ou superfície de animais e são transportadas para o ambiente marinho. As leveduras obrigatórias possuem tolerância inerente a NaCl, bem como atividades fermentativas sob condições de elevada concentração de sal, ao passo que as facultativas apresentam fraca tolerância, adquirindo-a gradativamente durante longos períodos. Ou seja, a exposição contante de leveduras facultativas à NaCl as transformam em organismos osmotolerantes (KANDASAMY; ALIKUNHI; SUBRAMANIAN, 2012).

Os microrganismos diferem quanto a tolerância ao estresse osmótico, mas em geral leveduras e fungos são mais tolerantes do que as bactérias. Entre as leveduras, as espécies *Debaromyces hansenii* e *Saccharomyces rouxii* são altamente osmotolerantes e capazes de crescer em meios contendo até cerca de 4 M de NaCl, enquanto *S. cerevisiae* é limitada por concentrações de NaCl acima de 1,7 M (KANDASAMY; ALIKUNHI; SUBRAMANIAN, 2012).

As leveduras marinhas são relatadas como agentes de biodegradação verdadeiramente versáteis, participam de uma série de processos ecologicamente significativos no mar, especialmente em ambientes estuarinos e perto da costa. Existem evidências de que os estuários contêm mais células de levedura/volume, como também apresentam maior diversidade de espécies (KUTY; PHILIP, 2008). Segundo esses mesmos autores isto pode ser devido à maior concentração de matéria orgânica nos estuários do que no habitat marinho.

Nesta perspectiva, o presente trabalho objetivou isolar e identificar leveduras marinhas do estuário da Lagoa da Conceição e analisar *in vitro* a cinética de crescimento em diferentes salinidades e a inibição de patógenos para posteriormente, avaliar *in vivo* a adição do inóculo com ao menos uma levedura na água de cultivo do camarão marinho e da mesma maneira estimar os parâmetros de qualidade de água, microbiológicos e zootécnicos do camarão branco do Pacífico cultivado em sistema sem renovação de água, mediante diferentes estratégias de fertilização para formação e manutenção do sistema de bioflocos.

2 JUSTIFICATIVA

A carcinicultura é considerada o ramo da aquicultura que mais cresce em todo o país, representando uma importante atividade econômica no setor produtivo. Contudo, a ocorrência de enfermidades é um dos principais fatores que comprometem o crescimento da atividade. Portanto, é imprescindível a adoção de práticas de produção que possam assegurar a sustentabilidade da atividade, possibilitando maior biossegurança, minimizando os impactos ambientais e reduzindo as taxas de renovação de água. O cultivo de camarões em sistema de bioflocos possibilita a intensificação, com mínima ou zero renovação de água, minimizando o fluxo de patógenos e a descarga de efluentes ricos em nutrientes no ambiente. No entanto, a intensificação dos sistemas de cultivo acarreta no maior acúmulo de resíduos metabólitos e orgânicos, que são prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento da espécie de cultivo. A manipulação da relação C/N, a reutilização de água e a introdução de microrganismos e enzimas na água de cultivo de camarões têm sido reportadas na melhoria da qualidade da água do cultivo, no entanto, poucos são os trabalhos de biorremediação envolvendo leveduras marinhas. Deste modo o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras marinhas e estimar sua atuação sobre a qualidade de água e o desempenho zootécnico de pós-larvas de *L. vannamei* quando suplementada na água de cultivo do camarão cultivado em sistema com diferentes estratégias de formação de flocos microbianos sem renovação de água.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o desenvolvimento do cultivo do camarão marinho *L. vannamei* em sistema de bioflocos, direcionando a comunidade microbiana e utilizando diferentes sistemas de fertilização de água.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e identificar leveduras marinhas do solo do estuário da Lagoa da Conceição;
- b) caracterizar *in vitro* o isolado quanto à cinética de crescimento em diferentes salinidades;
- c) avaliar *in vitro* a levedura quanto à capacidade de inibição da bactéria patogênica ao camarão marinho, *Vibrio alginolyticus*;
- d) estimar *in vitro* a biossegurança da levedura isolada;
- e) analisar *in vivo* o efeito da levedura sobre parâmetros microbiológicos, zootécnicos e de qualidade de água do cultivo de pós-larvas de *L. vannamei* quando suplementada na água em sistema de bioflocos sem renovação de água;
- f) avaliar o efeito da reutilização de água de bioflocos em um novo ciclo de cultivo de *L. vannamei* em sistema BFT;
- g) avaliar o efeito da manipulação da relação C/N sobre a formação de flocos microbianos;
- h) comparar diferentes estratégias de fertilização, reutilização de água com bioflocos e manipulação da relação Carbono/Nitrogênio, avaliando seus efeitos na formação de bioflocos, no crescimento e na sobrevivência de *L. vannamei*, sem renovação de água.

4 FORMATAÇÃO DO ARTIGO

A dissertação está dividida em dois capítulos, o primeiro referente à introdução geral e o segundo se refere a um artigo formatado de acordo com a revista “*Aquaculture*”, conceito Qualis da CAPES A2 e fator de impacto 2.570

***Meyerozyma guilliermondii* Associada à Estratégias De Fertilização
No Cultivo De *Litopenaeus vannamei* em Sistema de Bioflocos;
Contribui com a Redução de Material Orgânico**

Natália L. Ferreira^{a*}, Tamiris H. Ferreira^a, Boris U. Stambuk^b, Sérgio L. A. Junior^c, Felipe N. Vieira^d, José L. P. Mouriño^a

^aLaboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, CEP:88062-601, Brasil

^bLaboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, CEP:88062-601, Brasil

^cUniversidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó – SC, CEP: CEP:85301-970, Brasil

^dLaboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, CEP:88062-601, Brasil

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atuação da levedura marinha *Meyerozyma guilliermondii* sob os parâmetros de qualidade de água, microbiológicos e zootécnicos de *Litopenaeus vannamei* quando suplementada na água de cultivo do camarão cultivado em sistema sem renovação de água, mediante diferentes estratégias de fertilização para formação do sistema de bioflocos. A cepa de levedura foi isolada do solo do estuário da Lagoa da Conceição e foi avaliada *in vitro* quanto à cinética de crescimento em diferentes salinidades e quanto à capacidade de inibição de patógenos. Nos testes *in vitro* levedura não apresentou características inibitórias frente ao patógeno *Vibrio alginolyticus* e tolerou os diferentes níveis de salinidade. Já nos testes *in vivo* a levedura foi adicionada na água de cultivo na concentração de $1,0 \times 10^4$ UFC·mL⁻¹ semanalmente para avaliar a manutenção e formação de flocos microbianos no cultivo de pós-larvas e estimar o seu efeito sobre o desempenho zootécnico de *L. vannamei* durante 30 dias. Para o ensaio a levedura foi suplementada na água de cultivo do camarão marinho cultivado sob diferentes sistemas de fertilização com reutilização parcial de água de bioflocos maduro e fertilização orgânica da água anterior ao povoamento para formação do sistema de bioflocos. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na interação tempo e sistemas de fertilização nos parâmetros de qualidade de água (amônia, nitrito, SST, SSV e SSed) e no ganho de peso semanal, bem como no direcionamento microbiano na concentração de sólidos e na sobrevivência. Os grupos tratados com *M. guilliermondii* apresentaram menor concentração de sólidos na água de cultivo ao final do período experimental e maior sobrevivência, com isso, conclui-se que a levedura *M. guilliermondii* pode ser aplicada no cultivo superintensivo de camarão sem renovação de água, apresentando efeitos imediatos na redução de sólidos gerados no sistema e na sobrevivência de *L. vannamei*.

Palavras-chave: bioflocos, fertilização orgânica, leveduras marinhas, *Litopenaeus vannamei*.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the performance of the marine yeast *Meyerozyma guilliermondii* on the water quality, microbiological and zootechnical parameters of *Litopenaeus vannamei* when supplemented in the culture water of shrimp cultivated in zero exchange system using different fertilization strategies to form biofloc system. The yeast strain was isolated from the soil of the Lagoa da Conceição estuary and was evaluated *in vitro* regarding its growth kinetics at different salinities and the ability to inhibit pathogens. In the *in vitro* assay *M. guilliermondii* did not present inhibitory characteristics against the pathogen *Vibrio alginolyticus* and tolerated the different levels of salinity. In the *in vivo* tests, the yeast was added in the culture water at the concentration of 1.0×10^4 CFU·mL⁻¹ weekly to evaluate the maintenance and formation of microbial flakes in post-larvae culture and to estimate its effect on the zootechnical performance of *L. vannamei* for 30 days. Therefore the yeast was supplemented in the culture water of marine shrimp grown under different fertilization systems, partial reuse of mature biofloc water and organic fertilization of the water prior to the stand for formation of the biofloc system. Weekly weight gain and water quality parameters (ammonia, nitrite, TSS, VSS and SS) have presented significant difference ($p < 0.05$) in the interaction time and fertilization system as well as microbial targeting in solids concentration and survival. The groups treated with *M. guilliermondii* showed lower solids concentration at the end of the experimental period and higher survival rate. Therewith, concluding that the yeast *M. guilliermondii* can be applied in superintensive shrimp cultivation without water renewal, presenting immediate effects on the reduction of solids generated in the system and on the survival of *L. vannamei*.

Keywords: biofloc, organic fertilization, marine yeasts, *Litopenaeus vannamei*.

1 Introdução

Diante das perdas econômicas enfrentadas pela carcinicultura mundial causadas pelo surto de doenças e em virtude das críticas quanto à sustentabilidade da atividade (Stentiford, 2012; Hargreaves, 2006), o sistema de cultivo em bioflocos tem sido apontado como uma alternativa viável aos sistemas tradicionais, uma vez que comporta alta densidade de estocagem e elevada produtividade (Krummenauer et al., 2011); ocupando menor área de terra, utilizando menor volume de água e com maior biossegurança frente às enfermidades virais (Hargreaves, 2006; Moss et al., 2012).

No entanto, o aumento da densidade de estocagem atrelado à renovação mínima de água acarreta no acúmulo de resíduos de ração, excretas e compostos inorgânicos tóxicos aos organismos cultivados (Burford et al., 2003; Van Wyk, 2006). Embora os camarões tolerem certos níveis de intensificação, o aumento da biomassa nos sistemas intensivos compromete a qualidade de água (Avnimelech, 2006, 2007).

Nos sistemas com mínima ou zero renovação de água o controle da qualidade da água pode ser feito através da reciclagem por filtros biológicos ou através do tratamento da água no próprio tanque, por meio de comunidades microbianas que se desenvolvem naturalmente na coluna d'água (Crab et al., 2007). No entanto, a comunidade microbiana pode demorar até seis semanas para se desenvolver adequadamente em um ciclo de cultivo (McIntosh, 2000).

A adição de diversas fontes de carbono na água para estimular o crescimento de microrganismos heterotróficos em viveiros de camarão tem sido demonstrada por diversos autores (Avnimelech, 1999; Burford et al., 2003; Hari et al., 2004). Samocha et al. (2012), demonstraram que a aplicação de melaço na água de cultivo em sistema superintensivo sem renovação de água reduz o tempo necessário para o desenvolvimento dos bioflocos para cinco semanas. Outros pesquisadores sugerem o uso de água de bioflocos de um ciclo de produção anterior para acelerar a formação da comunidade microbiana em sistemas recém-iniciados (Krummenauer et al., 2011; Mcabee et al., 2003). Segundo Krummenauer et al. (2012) uma vantagem que o sistema de bioflocos apresenta é a possibilidade de utilização da água por diversos ciclos de cultivo.

A reutilização de água é uma técnica que tem se mostrado eficiente na manutenção dos níveis dos compostos nitrogenados abaixo das concentrações que afetam a espécie em cultivo. Podendo estabilizar as comunidades microbianas e os parâmetros de qualidade de água mais

rapidamente, encurtando o período de cultivo e minimizando possíveis problemas com os compostos nitrogenados, assim como reduz os custos com bombeamento de água, diminui os insumos e o tratamento de efluentes nos sistemas de cultivo, além de possibilitar a reciclagem dos nutrientes presentes na coluna d'água (Samocha et al., 2010). Segundo Krummenauer et al. (2011), o reuso de 2,5% de água de um cultivo anterior acelera a formação dos agregados microbianos e contribui para a manutenção da qualidade da água.

Em sistemas fechados a comunidade microbiana sofre alterações em termos de biomassa e de função ao longo do cultivo, desde a estocagem até o final do ciclo de produção (Tallamy e Moss, 2006). Alguns estudos demonstram que fatores abióticos, como variações nas taxas de remoção de sólidos, razão C/N da ração, alcalinidade da água, nível de oxigênio e intensidade luminosa podem exercer efeito sobre a comunidade microbiana (Ebeling et al., 2006; Hargreaves, 2006; Van Wyk, 2006; De Schryver et al., 2008). Browdy et al. (2001) ressaltam que sem o manejo de sólidos, a comunidade microbiana no cultivo de camarão em sistemas fechados, tende a mudar de uma comunidade predominante por algas para uma comunidade dominada por microrganismos heterotróficos.

O sistema de bioflocos é dotado por uma microbiota diversificada, que incluem bactérias benéficas e neutras, bem como bactérias patogênicas e oportunistas (Schulze et al., 2006). Anand et al. (2014) apontam que os principais microrganismos encontrados em sistema de biofoco pertence a bactérias do gênero *Vibrio* sp., *Bacillus* sp. e *Lactobacillus* sp.

No cultivo do camarão marinho o equilíbrio ecológico entre bactérias patogênicas pode ser alterado por práticas de manejo inadequadas, levando a proliferação das mesmas (Karunasagar et al. 1994). Dentre as bactérias oportunistas no cultivo de bioflocos, se destacam as bactérias marinhas do gênero *Vibrio* (Song and Lee, 1983). Diversas espécies de *Vibrio* já foram reportadas como patogênica ao camarão. Recentemente o *Vibrio parahaemolyticus*, conhecido como Síndrome de Mortalidade Precoce (EMS) ou Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), tem causado mortalidade nos sistemas de cultivo de *L. vannamei* (Leão e Mohan, 2012).

Na aquicultura, o controle de enfermidades ocorre por intermédio de antibióticos. Contudo, o uso indiscriminado resulta na seleção de bactérias resistentes, na disseminação de genes de resistência entre bactérias patogênicas/comensais e no impacto ambiental (contaminação de água e sedimentos) (Newaj-Fyzuleta et al., 2014). Como alternativa

ao uso de quimioterápicos, a bioaumentação (do inglês - *Bioaugmentation*) vem ganhando espaço como uma estratégia de manejo para prevenir o surto de enfermidades e manter a qualidade de água no cultivo de organismos aquáticos (Janeo et al., 2009).

A bioaumentação é uma técnica de biorremediação que consiste na inclusão de microrganismos no ambiente aquático visando acelerar a remoção e a biodegradação de um contaminante indesejável. A comunidade microbiana pode ser de origem autóctone, alóctone e geneticamente modificada. Tem se tornado uma prática cada vez mais comum na aquicultura (Jiao et al., 2011).

A ação microbiana no sistema aquático promove um ambiente favorável para o crescimento da espécie foco de cultivo e a supressão do crescimento de patógenos na coluna d'água. Fazem parte destes grupos bactérias e fungos (Zhou et al., 2009).

As leveduras são microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, unicelulares, eucariontes, (Madigan et al., 2010) heterotróficos (Rodrigues et al., 2006) e compõem a classe *Saccharomycota* e filo *Ascomycota* (Kurtzman et al., 2011a, 2011b). No ambiente aquático encontram-se amplamente distribuídas na coluna d'água, no sedimento, em plantas e animais. Atuam na decomposição de substratos, reciclagem de nutrientes, biodegradação de óleos e compostos recalcitrantes (Meyers e Ahearn, 1974).

Dentre as aplicações biotecnológicas das leveduras, vem sendo dada atenção ao seu uso de degradação de poluentes e no tratamento de efluentes (Chigusa et al., 1996). Já tendo sido descritas com capacidade de degradar e oxidar diversas substâncias (Jiang et al., 2010; Yang et al., 2003; Zheng et al., 2009; De Los et al., 2012; Zinjarde e Pant, 2002; Rajpert et al., 2013). Segundo Zinjarde et al. (2014) cepas de *Yarrowia lipolytica*, isolada de solos, água do mar, sedimentos e águas residuais, possuem habilidades fisiológicas para biorremediação ambiental.

Na aquicultura o papel das leveduras tem sido preconizado em produtos comerciais que utilizam em seu conteúdo principalmente bactérias nitrificantes e/ou sulfóforas, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., fungos, como *Aspergillus* sp., leveduras e/ou o mix destes microrganismos (Zhou et al., 2009); o qual inclui em maior número bactérias e leveduras. Sendo *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* as principais espécies de leveduras utilizadas (Diver, 2001). Segundo Zhou et al. (2009) no ambiente aquático, os produtos biorremediadores atuam de várias formas, seja reduzindo substâncias inorgânicas e orgânicas para uso como energia, ou mesmo utilizando o acúmulo de

matéria orgânica no fundo dos viveiros como fonte de carbono para a produção de biomassa microbiana.

As diferentes leveduras utilizadas como biorremediadores diferem quanto à tolerância ao estresse osmótico, mas em geral leveduras e fungos são mais tolerantes do que as bactérias. Entre as leveduras, as espécies *Debaromyces hansenii* e *Saccharomyces rouxii* são altamente osmotolerantes e capazes de crescer em meios contendo até cerca de 4 M de NaCl, enquanto *S. cerevisiae* é limitada por concentrações de NaCl acima de 1,7 M (Kandasamy et al., 2012).

A manipulação da relação carbono/nitrogênio (C/N), a reutilização de água e a introdução de microrganismos na água de cultivo de camarões também têm sido reportadas na melhoria da qualidade da água do cultivo de organismos aquáticos, porém, poucos são os trabalhos de biorremediação envolvendo leveduras marinhas quanto ao direcionamento microbiano desejado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a levedura marinha *Meyerozyma guilliermondii* CPQBA 1459/17 DRM-01 quanto a sua atuação sobre os parâmetros de qualidade de água, microbiológicos e zootécnicos de *L. vannamei* quando suplementada na água de cultivo do camarão marinho cultivado em sistema sem renovação de água com diferentes estratégias de fertilização para formação e manutenção de flocos microbianos.

2 Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS) e no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), pertencentes ao Departamento de Aquicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil. O estudo foi dividido em duas etapas, análises *in vitro*, realizadas no AQUOS e ensaio *in vivo*, executado no LCM.

In vitro foi realizado o isolamento de levedura oriunda do solo do estuário da Lagoa da Conceição, avaliando a cinética de crescimento em diferentes salinidades e a capacidade de inibição de patógenos para posteriormente suplementar a levedura isolada na água de cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos com diferentes estratégias de fertilização a fim de verificar seu potencial na biorremediação e seus resultados no desempenho zootécnico do camarão.

2.1 Análises *in vitro*

2.1.1 Isolamento de levedura marinha

O isolamento foi realizado a partir do solo da Lagoa da Conceição próximo ao Canal da Barra da Lagoa (latitude 27°33' sul - longitude 48°27' oeste).

Foram coletadas 10 amostras de solo com o auxílio de pá estéril desde uma camada superficial até 5 cm de profundidade, acondicionadas em frascos estéreis, etiquetadas e posteriormente transportadas refrigeradas a 4°C para processamento. Para o crescimento e isolamento de leveduras foi utilizado meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (SD) (Kasvi®).

Com as amostras de solo coletadas foi feita uma suspensão de 5g de solo em 50 ml do meio de cultura líquido Sabouraud Dextrose (SD) (Kasvi®) submetida à agitação em agitador magnético por 30 minutos, seguidos por 10 min de repouso para posteriormente utilizar o sobrenadante da suspensão de leveduras para isolamento, conforme a metodologia proposta por (Yarrow, 1998). Com o sobrenadante da solução de leveduras foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em solução salina estéril (3% NaCl), homogeneizadas e posteriormente alíquotas de 100 µL de cada diluição foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo SD Agar e incubadas a 25°C em estufa bacteriológica por 5 dias. As colônias crescidas foram analisadas quanto às suas características macromorfológicas segundo os critérios descritos por Kurtzman et al. (2011c): coloração, tamanho, características da margem e superfície, textura, brilho e forma da superfície; e morfológicamente pelo método de coloração de Gram, observando a presença de estruturas arredondadas ou ovais em brotamento (blastoconídios), associadas ou não à presença de hifas e pseudo-hifas (Yarrow, 1998).

2.1.2 Cinética de crescimento em diferentes salinidades

A cepa foi incubada em tubo de ensaio contendo 9 mL de meio de cultura líquido SD e mantida por 24 h em estufa bacteriológica a 30°C. Passadas as 24 h, os 10 mL contidos em cada tubo foram então vertidos em 90 mL de SD líquido, contendo diferentes concentrações de NaCl (0%, 1%, 2% e 3%), e incubados a 30°C sob agitação contínua (2,53 g). O monitoramento do crescimento foi realizado pela contagem de células de levedura em Câmara de Neubauer conforme descrito por

Lee et al. (1981). A concentração do inóculo inicial e final foi transformada em unidades formadoras de colônia (UFC·mL⁻¹) para calcular a velocidade máxima de crescimento (μ_{\max}) e o tempo de duplicação (t_{dup}), segundo as seguintes equações:

Velocidade máxima:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(Z) - \ln(Z_0)}{dt}$$

Onde:

μ_{\max} = velocidade máxima de crescimento

Z = concentração (UFC·mL⁻¹)

Z₀ = concentração inicial do inóculo (UFC·mL⁻¹)

dt = tempo de cultivo (horas)

Tempo de duplicação:

$$t_{dup} = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

Onde:

t_{dup} = tempo de duplicação (horas)

μ_{\max} = velocidade máxima de crescimento

2.1.3 Inibição de patógenos *in vitro*

A bactéria patogênica ao camarão marinho *Vibrio alginolyticus* (BCCM 2068), proveniente do setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), foi reativada em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Himedia®) com 3% de NaCl e incubada a 30°C por 24 h para posterior utilização no teste de antagonismo.

Para mensurar o potencial antagônico da levedura isolada frente ao *V. alginolyticus* foram utilizadas duas técnicas - difusão de disco em Agar (Clinical e Laboratory Standards Institute, 2013) e perfuração de poços conforme a metodologia descrita por Caruffo et al. (2015). A técnica de difusão em Agar consistiu em semear a levedura isolada diretamente em Agar SD, repicar o *V. alginolyticus* em BHI 3% de NaCl e incubar ambos a 30°C por 48 h e 24 h respectivamente. Em seguida, discos de Agar de aproximadamente 0,8 mm de diâmetro foram retirados em quadruplicata da placa contendo a cepa de levedura previamente crescida e colocados sobre o meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) (Kasvi®) recém-semeado com *V. alginolyticus*. E incubadas a 30°C por 24 h. A atividade antagônica foi expressa pelo diâmetro em milímetros da zona de inibição.

Para a técnica de perfuração em Agar, o *V. alginolyticus* foi semeado em Agar Tripton de Soja (TSA) (Kasvi®) 0,5% de NaCl. Posteriormente, foram realizadas perfurações de 6 mm de diâmetro nas placas de TSA e preenchidos com 100 µL de uma cultura de levedura de 48 h. Para isso, realizou-se o crescimento da levedura em tubos de ensaio contendo caldo SD, por 48 h a 30°C. As placas então foram incubadas em estufa a 30°C por 24 h. Após esse período, o antagonismo foi determinado pela presença do halo de inibição, região clarificada ao redor do poço perfurado.

2.1.4 Identificação da cepa de levedura isolada

O isolado foi encaminhado para identificação molecular utilizando o sequenciamento e análise filogenética do DNA ribossomal 26S e 5,8S na Universidade Federal de Campinas (UNICAMP) e na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) respectivamente.

A metodologia consistiu na amplificação da região D1/D2 (DNAr 26s) e ITS1 (Internal Transcribed Spacer) (DNAr 5,8s) pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído da amostra. Os primers (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram NL-1m, NL-4m e ITS1 complementares às extremidades da região D1/D2 e ITS1. Os fragmentos amplificados foram a seguir purificados em coluna (FRX PCR e Gel Band Purification Kit, GE Healthcare®) e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciados ABI3500XL Series (Applied Biosystem®).

Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram NI-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG), NI-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G) e ITS1 (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A). As sequências parciais das regiões D1/D2 e ITS1 obtidas com os *primers* foram montadas em um consensus (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados Genbank (2017). As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA versão 6.0 (Tamura et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), com valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando software de rotina incluído no programa MEGA 6.0®.

2.2 Formação de flocos microbianos e adição de *M. guilliermondii* na água de cultivo de *L. vannamei*

2.2.1 Preparo do inóculo

Para preparo do inóculo a cepa foi cultivada em caldo SD e incubada a 30°C por 24 h com aeração constante. Após este período foi realizada a contagem do número de células de levedura em câmara de Neubauer e a concentração do inóculo ajustada para $1,0 \times 10^4$ UFC·mL⁻¹ com auxílio da curva de crescimento padrão previamente estabelecida.

2.2.2 Material Biológico

Para realização do experimento foram utilizadas 1920 pós-larvas de 37 dias (PL 37) de *L. vannamei* provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC (LCM/UFSC).

2.2.3 Delineamento experimental

O efeito de diferentes estratégias de fertilização e da manipulação microbiana sobre a água do cultivo superintensivo de *L. vannamei* sem renovação de água foi estudado durante 30 dias.

Inicialmente, a água utilizada no cultivo foi tratada com hipoclorito de sódio (2,5 g·L⁻¹) e neutralizada com tiosulfato de sódio (2 g·L⁻¹).

Para estimular a formação dos agregados microbianos foram utilizados dois sistemas de fertilização: 1. Fertilização orgânica da água, por meio de uma fonte de carbono (açúcar) e ração anterior ao povoamento na proporção C/N de 15:1 (Avnimelech, 1999; Ebeling et al. 2006); 2. Reutilização parcial (40 L) de água de um cultivo prévio de *L. vannamei* em sistema de bioflocos a partir de um tanque de matriz de 45 m³ que apresentava 300 mg·L⁻¹ de sólidos suspensos totais (SST), alcalinidade de 100 mg·L⁻¹ e 1,61 mg·L⁻¹ de amônia total (TAN).

O direcionamento microbiano foi realizado por intermédio da adição diária do inóculo de levedura na água de cultivo.

Foram utilizadas dezesseis unidades de 60 L povoadas em um delineamento inteiramente ao acaso com quatro tratamentos em quadruplicata:

- Reutilização de 40 L de água de biofloco maduro no dia do povoamento com adição diária do inóculo de levedura na concentração de 1×10^4 UFC·mL⁻¹ (RL);

- Reutilização de 40 L de água de biofloco maduro no dia do povoamento, sem adição do inóculo de levedura (R);

- Fertilização da água de cultivo (C/N 15:1), três dias antes do povoamento, com adição diária do inóculo de levedura na concentração de 1×10^4 UFC·mL⁻¹ (FL);

- Fertilização da água de cultivo (C/N 15:1), três dias antes do povoamento, sem adição do inóculo de levedura (F).

Nos tratamentos correspondentes a reutilização de água foi adicionado 20 L de água clara com salinidade de 35 g·L⁻¹, previamente filtrada e tratada, para completar o volume total dos tanques (60 L).

Cada unidade experimental foi composta por um tanque de fundo U com capacidade de 60 L, equipada com substrato artificial e com aeração linear fornecida por um tubo de PVC (90 cm de comprimento, 20 mm de diâmetro e com 36 furos de 1 mm) para manter os sólidos gerados durante o cultivo em suspensão e manter o nível de oxigênio dissolvido na água na concentração recomendada para o cultivo de *L. vannamei* (> 5 mg L⁻¹). A temperatura da água foi mantida constante, entre 28 e 30°C, utilizando aquecedores de 100 W ligados a um termostato.

Foram utilizadas 120 pós-larvas de *L. vannamei* por tanque, com peso médio de 0,1 grama, alimentadas com ração comercial 45% de proteína bruta (PB) distribuída em 4 períodos (08:30, 11:30, 14:00 e às 17:00). A quantidade de ração foi calculada segundo a tabela de alimentação descrita por Van Wyk e Scarpa (1999) e ajustada semanalmente a cada biometria segundo a biomassa.

A concentração de amônia foi regulada a partir da fertilização com carbono orgânico, açúcar branco, de duas maneiras: 1) Para neutralizar a amônia excretada pelo camarão, assumindo que o camarão assimila cerca de 25% do nitrogênio adicionado na alimentação e 75% deste nitrogênio é transformado em amônia dissolvida na água. O açúcar foi adicionado a cada tanque a uma proporção de 20g de carboidrato para cada grama de amônia total (TAN) (Avnimeleh, 1999); 2) Quando a amônia total ultrapassou 1 mg L⁻¹, foi adicionada ao sistema carboidrato (açúcar branco) considerando a mesma relação (20 g carboidrato:1 g de amônia total) (Avnimeleh, 1999).

Para manter a alcalinidade acima de 120 mg·L⁻¹ e o pH superior a 7, foi adicionado de 10 a 20 % da ração do dia anterior de hidróxido de

cálcio (Pierri, 2012). Durante o ensaio no houve renovação de água, havendo apenas a reposição de água doce por perdas na evaporação.

2.2.4 Parâmetros físicos e químicos de qualidade de água

O oxigênio dissolvido e a temperatura foram medidos uma vez ao dia (Oxímetro YSI Pro 20®). O pH (pHmetro Thermo scientific Orion Star A211®), a salinidade (Salinômetro digital Ecosense EC300A®), os sólidos suspensos totais (APHA, 2005) (2540 D), sólidos voláteis e fixos (APHA, 2005) (2540 E), os sólidos sedimentáveis (Cone Imhof) a alcalinidade (APHA, 2005) (2320 B), amônia e nitrito (Strickland e Parsons, 1984) foram monitorados a cada três dias. O nitrato (kit comercial, Hach ACA01®) e o ortofosfato (Grasshoff et al., 1983) foram analisados no início e ao final do experimento.

2.2.5 Parâmetros microbiológicos

Para averiguação de possíveis alterações na microbiota da água de cultivo, análises microbiológicas foram realizadas uma vez a cada semana de experimento pela determinação da concentração de bactérias heterotróficas totais, vibriônicas e de leveduras na água de cultivo.

Amostras de 10 mL de água de cada tratamento foram coletadas com o auxílio de tubos de ensaio estéreis. Foram realizadas diluições seriadas e semeadas em meio de cultura Agar Marine (Himedia®), Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) (Himedia®) e Sabouraud Dextrose (Kasvi®) acrescido de Cloranfenicol ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e incubadas a 30°C . As unidades formadoras de colônia foram quantificadas após 24 h para bactérias heterotróficas totais e vibriônicas e após 48 h para leveduras.

2.2.6 Desempenho zootécnico

Para o povoamento foi realizada biometria das pós-larvas do tanque matriz com amostragens aleatórias e calculando assim o peso de povoamento de acordo com a seguinte fórmula:

Peso povoamento (g): média (g) x número de animais por tanque

Foram realizadas biometrias semanais de cada unidade experimental e ao final do experimento foram avaliados os seguintes parâmetros zootécnicos:

Peso médio final (g): Biomassa/Número final de camarões;

Sobrevivência (%): (Número final de pós-larvas/Número inicial de camarões) x 100;

Ganho de peso semanal (g/semana): (Peso médio final - Peso médio inicial/Semanas de cultivo);

Produtividade (kg.m⁻³): Biomassa final/Área total.

2.2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk (Zars, 1984) e posteriormente foram comparados pela análise de variância multivariada (MANOVA) segundo o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições; quando detectada diferença foi aplicado o teste de Tukey. Todos a nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas no programa STATISTICA 10.0[®]. Todos os dados estão apresentados em termos de média \pm desvio padrão.

3. Resultados e Discussão

3.1 Identificação molecular

Foi isolada uma cepa de levedura do solo do estuário da Lagoa da Conceição, sendo identificada como *Meyerozyma guilliermondii* CPQBA 1459/17 DRM-01 (Anexo - A) (Apêndice A - Figura 1 e 2). Segundo Brunke e Fischer (1999), partículas de sedimento apresentam condições favoráveis de proteção contra luz solar e contra predação por outros organismos (Davies e Bavor, 2000) além de apresentar alta concentração de nutrientes, fornecendo condições favoráveis para a manutenção das populações de leveduras. Kutty e Philip (2008) apontam que a maioria das espécies de levedura estão associadas a ocorrência de matéria orgânica, sendo as maiores densidades associadas a concentrações de açúcares disponíveis para assimilação e outras fontes de carbono. Segundo Fell et al. (1960) as leveduras são mais abundantes em ambientes ricos em material orgânicos, sendo os gêneros *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* e *Candida* os mais frequentemente isolados. Na literatura a levedura *M. guilliermondii* é frequentemente isolada de ambientes aquáticos eutrofizados como demonstrado por Medeiros et al. (2008), Brandão et al. (2010) e Brilhante et al. (2011). Papon et al. (2013) sugerem que *M. guilliermondii* é capaz de usar várias fontes de carbono, contribuindo assim para a biorremediação de solo.

TGGATCTTTTGAGCGCTTACTGCGGGCGAAACCTTACACACAGT
 GTCTTTTGTATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCTAGAGATAGG
 TTGGGCCAGAGGTTTAACAAAACACAATTTAATTATTTTACAGTT
 AGTCAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
 GGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATA
 TGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
 CGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTCT
 CTCTCAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGGAC
 TAGGCGTTTGCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTAGATAGT
 GCTGTCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAATGG
 TGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCGGCTTACAACAAC
 CAAACAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCT
 AAGCATATCAAATCCGGAGGAA

Fig. 1. Sequências parciais de DNA da região 5,8S obtidas e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados Genbank.

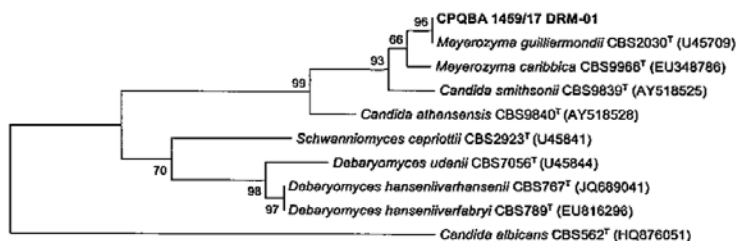


Fig. 2. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial da região D1/D2 obtida e comparadas com as sequências de organismos representados na base de dados Genbank.

3.2 Cinética de crescimento em diferentes salinidades

Na carcinicultura marinha, a variação da salinidade dos cultivos depende diretamente da região, época do ano e índice de pluviosidade e pode variar de valores próximos a zero até águas com salinidade superior a oceânica, como ocorre em ambientes hipersalinos (Araneda et al., 2008). Sendo assim, é importante que a levedura possa suportar ampla variação de salinidade. Segundo Goto et al. (1972), a maior parte das leveduras, sem levar em conta o habitat do qual foram isoladas, é capaz de crescer com salinidade igual ou superior a da água do mar e geralmente crescem com o dobro dessas concentrações. Indicando que a alta tolerância ao sal é importante na seleção natural de leveduras de ambiente marinho. A cinética de crescimento de *M. guilliermondii* em

resposta à salinidade encontra-se descrita na e na Tabela 3 respectivamente.

Tabela 2 - Velocidade de crescimento e tempo de duplicação da levedura *M. guilliermondii* em caldo Sabourud acrescido de 0%, 1%, 2% e 3% de NaCl

Salinidade	Velocidade de crescimento (h^{-1})	Tempo de duplicação (h^{-1})
0%	$0,09 \pm 0,01^a$	$7,70 \pm 0,01^c$
1%	$0,049 \pm 0,02^b$	$14,14 \pm 0,02^a$
2%	$0,064 \pm 0,01^c$	$10,83 \pm 0,001^b$
3%	$0,044 \pm 0,02^b$	$15,75 \pm 0,01^a$

Dados médios \pm desvio padrão. Letras diferentes na coluna representam diferença estatística pelo teste de Tukey a nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Lahav et al. (2002) destacam *M. guilliermondii* como um dos microrganismos com maior ocorrência em águas residuais hipersalinas, sendo capaz de crescer com alta variação de salinidades e pH. Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, onde *M. guilliermondii* foi capaz de crescer na presença de diferentes salinidades. Em estudo realizado por Watson (1970), avaliando os efeitos de NaCl (1.0 M) no crescimento e metabolismo de *S. cerevisiae* foi observado que os parâmetros da cinética de crescimento (velocidade de crescimento e tempo de duplicação) da levedura foi influenciado negativamente pela presença de cloreto de sódio do meio. Enquanto Dhar et al. (2011) reportaram que 0.5 M de NaCl não afetou a velocidade de crescimento e tempo de duplicação de *S. cerevisiae*. Garcia et al. (1997) ao comparar a tolerância relativa ao estresse osmótico da levedura fermentativa *S. cerevisiae* e da levedura respiratória *Candida tropicalis* e observaram que na presença de NaCl 1 M *C. tropicalis* foi capaz de crescer mais rapidamente do que *S. cerevisiae* devido ao seu metabolismo. Na ausência de NaCl a velocidade de crescimento de *C. tropicalis* foi de $0,43 \text{ h}^{-1}$, enquanto que a de *S. cerevisiae* foi de $0,26 \text{ h}^{-1}$. Na presença de NaCl 1 M, *C. tropicalis* mostrou uma redução de 30% na velocidade de crescimento, enquanto no caso de *S. cerevisiae* a redução da taxa de crescimento foi muito maior (70%). Sugerindo que *C. tropicalis* cresce melhor do que *S. cerevisiae* em altas concentrações de NaCl, não só devido ao seu metabolismo respiratório mais vigoroso, mas também devido à sua maior tolerância ao sal. Estes resultados indicam que estas espécies de levedura diferem na sua sensibilidade relativa à toxicidade catiônica (sódio). Andlid et al. (1988) relataram que

o tempo de duplicação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CBS 7764 foi de $8,4 \pm 0,2$ em meio *Yeast Nitrogen Base* sem NaCl. Enquanto, no presente estudo, *M. guilliermondii* apresentou tempo de duplicação $7,70 \text{ h}^{-1}$ e velocidade de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$ quando não foi suplementado NaCl. Segundo Kutty e Philip (2008) leveduras marinhas devem ser capazes de crescer em e/ou sobre substratos marinhos. Fato esse que foi observado no trabalho, onde a levedura *M. guilliermondii* apresentou melhores parâmetros de cinética de crescimento quando submetida à presença de NaCl, com maior velocidade de crescimento em 2% de NaCl ($0,064 \text{ h}^{-1}$) e tempo de duplicação em 1 e 3% .

3.3 Inibição de patógenos *in vitro*

Numerosos são os trabalhos que relatam a atividade antimicrobiana de actinomicetos isolados de ambientes marinhos, no entanto, apresentam diferentes resultados. Zheng et al. (2000) constataram que 43,6% dos actinomicetos isolados de ambiente marinho apresentaram atividade antimicrobiana, mas apenas 12,8% produziram metabólitos antimicrobianos contra *Vibrio* spp. Enquanto You et al. (2005) verificaram que cerca de 51,1% dos isolados de actinomicetos mostraram atividades antagônicas frente a *Vibrio* spp. e que 24,5% poderiam inibir o crescimento do *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. neresis* e *V. fluvialis*. Fato esse que não foi observado no presente trabalho, em que *M. guilliermondii* não apresentou características inibitórias perante a bactéria patogênica ao camarão marinho *V. alginolyticus* BCCM 2068. Auclair (2001) ressalta que apesar das leveduras não inibirem o crescimento de vibrios, estudos indicam que a levedura *S. cerevisiae* têm mostrado atividade antagônica *in vitro* diante de outros microrganismos como *Candida albicans*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella*.

3.4 Formação de flocos microbianos e adição de *M. guilliermondii* na água de cultivo de *L. vannamei*

3.4.1 Parâmetros de qualidade de água

Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de qualidade de água entre os tratamentos, com exceção na concentração de sólidos. Os valores médios diários de temperatura e oxigênio foram de $28,61^\circ\text{C} \pm 0,07$ e $5,32 \pm 0,03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente e

estiveram dentro das condições ideais para o cultivo da espécie (Van Wyk e Scarpa, 1999). A salidade foi de $36,32 \pm 0,42$. O pH e a alcalinidade se mantiveram estáveis, $8,00 \pm 0,00$ e $176,10 \pm 11,86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ concomitantemente, uma vez que houve a aplicação de hidróxido de cálcio. Ambos estiveram dentro do esperado para cultivo em sistema de bioflocos (Van Wyk e Scarpa, 1999).

Os compostos inorgânicos dissolvidos, amônia, nitrito, nitrato e fosfato não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. O manejo de fertilização efetuado para controle da amônia se mostrou eficiente, como em outros trabalhos de cultivo em meio heterotrófico com mínima renovação de água (Burford et al. 2003). Segundo Lin e Chen (2001) o nível de segurança para juvenis de *L. vannamei* em salinidade de 25-35 é de $3,55\text{-}3,95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de nitrogênio na forma de amônia total (TAN). No presente estudo, a concentração média de amônia total esteve dentro dessa faixa em todos os tratamentos, com valor máximo de $3,11 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nos tratamentos com reutilização de água de biofoco. Conforme Colt (2006) a reutilização de água pode resultar no aumento da concentração de alguns compostos nitrogenados no cultivo.

A concentração de nitrito segura para juvenies de *L. vannamei* em salinidade 25 é de $25,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Lin e Chen, 2003). No presente estudo as concentrações de nitrito observadas foram inferiores $0,40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Sugerindo a oxidação completa da amônia a nitrato ao longo do período experimental (Cohen et al. 2005). De acordo McAbee et al. (2003) a reutilização de água de biofoco ajudou manter baixos os níveis de nitrito.

Ao contrário da amônia e do nitrito, o nitrato (NO_3) é pouco tóxico aos organismos aquáticos (Van Rijn et al., 2006). Segundo Van Wyk e Scarpa (1999), concentrações inferiores ou iguais a $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de não afetam a sobrevivência e o crescimento do camarão marinho. No presente ensaio foi verificado que a concentração de nitrato em todos os tratamentos estiveram abaixo de $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em todos os tratamentos, com valores médios de $2,79 \pm 0,44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ no início do experimento e $5,73 \pm 1,19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ao final dos 30 dias. A presença de nitrato e os baixos valores de nitrito indicaram que ocorreu a oxidação completa da amônia através das bactérias quimioautotróficas em todos os tratamentos (Ebeling et al., 2006).

Os sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos sedimentáveis (SSed) apresentaram crescimento

gradativo durante todo o experimento sendo observada diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4).

A concentração de SST foi significativamente menor ($p<0,05$) nos tratamentos com reutilização de água (Tabela 4). Sugerindo que o desenvolvimento da comunidade microbiana foi mais efetivo do que nos tratamentos de fertilização. Resultados semelhantes foram reportados por diversos autores como McAbee et al. (2003), ao comparar reutilização de água com água clara, bem como Krummenauer et al. (2011) e Samocha et al. (2012) que em sistemas sem renovação, utilizaram água de bioflocos maduro para acelerar o desenvolvimento da comunidade microbiana, assim observando rapidamente a estabilização bacteriana.

Em sistemas fechados, a concentração de sólidos suspensos totais (SST) tende a aumentar ao longo do tempo principalmente devido ao aumento da biomassa microbiana (Avnimelech, 2009). Segundo Avnimelech (2009) concentrações de SST acima de $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ podem interferir nos parâmetros de qualidade da água e desempenho zootécnico do camarão, sugerindo então manter os níveis entre $200\text{-}500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Enquanto outros autores apontam que a faixa ideal para cultivo de *L. vannamei* é $400\text{-}500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Gaona et al., 2012; Samocha et al., 2007; Schweizer et al., 2013). Diferentes métodos têm sido listados como ferramentas potenciais no controle dos níveis de sólidos em sistemas fechados, entre eles a renovação de água (Ray et al., 2010). No entanto, durante o período experimental não foi renovada a água de nenhum dos tratamentos ou feitas tentativas para controlar os níveis de SST, os quais alcançaram valores máximos de $1435,25\pm258,48 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1220\pm70,72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nos tratamentos que não foram suplementados com a levedura *M. guilliermondii* (Tabela 4).

De acordo Thomas et al. (1992) a adição de agentes bioaumentadores na água de cultivo acelera os processos de mineralização, reduzindo assim o acúmulo de resíduos orgânicos e consequentemente melhorando a qualidade da água. Evento este que foi verificado no presente estudo no 30º dia, onde a concentração de SST foi significativamente menor ($p<0,05$) nos grupos suplementados com *M. guilliermondii* ($712\pm114,53$ e $725,25\pm209,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) do que os grupos que não foram suplementados com a (Tabela 4). Resultados semelhantes foram reportados por Janeo et al. (2009) ao testar aplicações semanais de *Bacillus* e *Nitrobacter* (VZT aquaculture®) verificou a redução na concentração de sólidos no cultivo de *Penaeus monodon*.

A concentração de SSV apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) somente entre os sistemas de fertilização. Onde os tratamentos com reutilização de água (RL e R) obtiveram menor concentração de SSV (Tabela 4). Isso sugere que houve uma grande quantidade de matéria orgânica de origem microbiana, provavelmente devido ao maior aporte de nutrientes, à formação de compostos nitrogenados e ao aumento da fertilização (Ebeling et al., 2006). Mesmo não havendo diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos suplementados com *M. guilliermondii* (1×10^4 UFC·mL⁻¹) e o controle, observa-se que os grupos tratados com a levedura (RL e FL) apresentaram concentrações de SSV inferiores àqueles sem levedura (Tabela 4).

Com o passar das 4 semanas de cultivo foi observada diferença significativas ($p < 0,05$) na concentração SSed (ou volume de flocos) entre os sistemas de fertilização. Na qual os tratamentos com reutilização (RL e R) apresentaram menor concentração (Tabela 4). Segundo Avnimelech (2009) o volume de sólidos sedimentáveis no cultivo de camarão em sistema BFT deve ficar em torno de 20 a 40 mL·L⁻¹. No presente estudo, o volume dos bioflocos manteve-se dentro dessa faixa em todos os tratamentos durante o período experimental, fato que pode ser justificado pela adesão das partículas e microorganismos que ficariam em suspensão aos substratos artificiais. Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos quando à suplementação de *M. guilliermondii* na água de cultivo.

Tabela 3 - Concentração de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos sedimentáveis (SSed) nos tratamentos Reutilização com levedura (RL), Reutilização (R), Fertilização com levedura (FL) e Fertilização (F) durante o cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos

Parâmetro (mg·L ⁻¹)	Tratamento	Dias		
		3	15	30
SST	RL	151,25±8,46 ^B	401,25±49,64 ^B	712±114,53 ^b
	R	131,75±6,24 ^B	340,75±100,45 ^B	1435,25±258,48 ^a
	FL	169,75±20,37 ^A	483,5±193,99 ^A	725,25±209,25 ^b
	F	168,75±13,82 ^A	611,25±213,40 ^A	1220±70,72 ^a
SSV	RL	79,25±47,63 ^B	151,75±27,98 ^B	465,33±187,42
	R	67,00±8,52 ^B	168,75±54,13 ^B	646,53±157,27
	FL	127,25±36,78 ^A	218,45±94,77 ^A	550,80±360,53
	F	139,75±20,76 ^A	280,88±69,18 ^A	693,48±127,67
SSed	RL	0,63±0,30 ^B	6,75±1,89 ^B	25,25±7,27
	R	0,55±0,19 ^B	5,75±2,87 ^B	18,50±4,04
	FL	1,33±0,35 ^A	12,50±10,25 ^A	27,50±9,95
	F	1,68±0,57 ^A	15,75±6,18 ^A	27,75±3,20

Dados médios ± desvio padrão.

Letras maiúsculas diferentes na coluna representam diferenças estatísticas nos sistemas de fertilização pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Letras minúsculas diferentes na coluna representam diferenças estatísticas quanto a suplementação de *M. guilliermondii* pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4.2 Parâmetros microbiológicos

Os sistemas de fertilização e a suplementação de levedura não influenciaram na microbiota da água. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para vibrios, bactérias heterotróficas totais e leveduras. Os resultados obtidos no ensaio *in vivo* em relação à contagem de vibriónáceas corroboram os dados de inibição *in vitro* de *V. alginolyticus* pela levedura *M. guilliermondii* isolada.

As bactérias heretotróficas totais apresentaram abundância média de 10^{10} UFC·mL⁻¹. Panjaitan (2010) obteve resultado semelhante, de 10^9 e 10^{10} células·mL⁻¹. Segundo Head (1998) o método de contagem de bactérias baseada em microbiologia aplicada subestima a medição quantitativa e qualitativa de populações de bactérias heterotróficas, podendo interferir na interpretação de resultados de biorremediação pela restrição de interpretação de fatores bióticos e abióticos. A contagem de

leveduras na água de cultivo dos tratamentos suplementados com *M. guilliermondii* foi similar a concentração do inóculo utilizada, de 1×10^4 UFC·ml⁻¹, indicando que a mesma se manteve presente no meio de cultivo durante os 30 dias de ensaio experimental.

3.4.3 Desempenho zootécnico

Após o período experimental foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de sobrevivência e ganho de peso semanal quanto aos sistemas de fertilização à manipulação microbiana, mas não na interação entre eles (Tabela 5). A utilização da levedura influenciou na sobrevivência, onde os grupos tratados com a levedura apresentaram maior sobrevivência sobre os demais (Tabela 5). A influência dos bioaumentadores na sobrevivência de camarões cultivados já foi relatada por outros autores (Moriarty, 1998, Janeo et al. 2009). Conforme Bomba et al. (2002) a seleção de cepas microbianas pode melhorar o aproveitamento do alimento e consequentemente a sobrevivência e crescimento do camarão.

O efeito da levedura sobre a sobrevivência dos camarões observado no presente estudo pode estar relacionado à sua contribuição no ambiente de cultivo. O ganho de peso semanal e o fator de conversão alimentar não foram influenciados pela utilização de *M. guilliermondii* e apresentaram diferença ($p < 0,05$) somente quanto aos sistemas de fertilização, onde o tratamento de reutilização se mostrou superior para ambos os parâmetros (Tabela 5). Fato esse que pode estar associado à produtividade natural e melhores parâmetros de qualidade da água nesses tratamentos (Krummenauer et al. 2012). A produtividade não apresentou diferença ($p < 0,05$) para os sistemas de fertilização nem para a utilização da levedura (Tabela 5).

Tabela 4 - Desempenho zootécnico do camarão branco do Pacífico cultivado em sistema de bioflocos sem renovação de água com quatro tratamentos, Reutilização com levedura (RL), Reutilização (R), Fertilização com levedura (FL) e Fertilização (F).

		Peso médio final (g)	Sobrevivência (%)	Ganho de peso semanal (g)	Produtividade (kg.m ³)
Trata- mentos	RL	1,32±0,09	96,46±5,46 ^a	0,31±0,02 ^A	2,561±0,266
	R	1,31±0,12	81,25±10,06 ^b	0,31±0,03 ^A	2,309±0,494
	FL	1,18±0,25	85,83±6,90 ^{ab}	0,30±0,03 ^B	2,046±0,502
	F	1,14±0,04	86,67±7,42 ^{ab}	0,27±0,07 ^B	2,171±0,353

Dados médios ± desvio padrão.

Letras maiúsculas diferentes na coluna representam diferenças estatísticas nos sistemas de fertilização pelo teste de Tukey ($p<0,05$); Letras minúsculas diferentes na coluna representam diferenças estatísticas quanto a suplementação de *M. guilliermondii* pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

A revisão sobre o uso de leveduras marinhas em sistemas de produção de organismos aquáticos é escassa e relativamente pequena quando comparada ao uso de leveduras em sistemas dulcícolas. O estudo da distribuição das mesmas e suas funções em ambientes de produção de camarões marinhos podem ainda ser melhor elucidados utilizando técnicas de biologia molecular como o NGS e metagenômica, aonde poderíamos entender mais a interação dos grupos microbianos envolvidos no sistema de bioflocos.

5 Conclusão

Foi possível isolar a levedura *Meyerozyma guilliermondii* do solo do estuário da Lagoa da Conceição. A qual, in vitro, não inibiu o patógeno *V. alginolyticus* BCCM 2068 e apresentou capacidade de crescer nas diferentes salinidades testadas. A suplementação de *M. guilliermondii* na água de cultivo de *L. vannamei* em sistema superintensivo de bioflocos diminuiu a quantidade de sólidos gerados em ambos os sistemas de fertilização com aumento na sobrevivência de pós-larvas de *L. vannamei*. Ademais, verificou-se que entre os sistemas de fertilização, o sistema de reutilização de água de bioflocos apresentou menor concentração de sólidos e maior ganho de peso semanal quando comparado com o sistema de fertilização.

Referências

- Anand, P.S.S., Kohli, M.P.S., Kumar, S., Sundaray, J.K., Roy, S.D., Venkateshwarlu, G., Sinha, A., Pailan, G.H., 2014. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 418–419, 108–115.
- Apha (American Public Health Association), 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. Byrd Prepress, Washington.
- Araneda, M., Perez, E. P. & Gasca-Leyva, E. 2008. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in fresh water at three densities: Condition state based on length and weight. *Aquaculture*, 283, 13–18.
- Auclair, E. Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. 200. *Ciheam-iamz, Zaragoza (Spain)*. v. 54. p. 45-53.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon: nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227-235.
- Avnimelech, Y., 2006. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. *Aquacult. Eng.* 34, 172–178.
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140-147.
- Avnimelech, Y. 2009, *Biofloc technology: A practical guide book*. . Baton Rouge, Louisiana - United States, The World Aquaculture Society. 182 p.
- Bomba, A., Nemcová R., Mudroň D., Guba P. 2002 The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 13, 121–126.
- Burford M.A., Thompson P.J., McIntosh R.P., Bauman R.H., Pearson D.C. 2003 Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219, 393–411.
- Brandão, L.R., Duarte, M.C., Barbosa, A.C., Rosa, C.A. 2009. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. *J Water Health* 2010; 8: 279-289. doi:10.2166/wh. 170.
- Brilhante RSN, Paiva MAN, Sampaio CMS, Teixeira CEC, Castelo-Branco DSCM, Leite. J JL, Moreira CA, Silva LP, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJ, Rocha MF. 2011 Yeasts from

- Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. FEMS Microbiol Ecol; 76: 268–277.
- Browdy, C.L., Bratvold, D., Stockes, A.D., McIntosh, R.P., 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp. 20–34.
- Brunke, M.; Fischer, H. Hyporheic bacteria: relationships to environmental gradients and invertebrates in a prealpine stream. *Archiv Hydrobiologie*, v. 146, n. 2, p. 189–217, 1999.
- Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., Feijóo, C. G., Navarrete, P. 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Frontiers in Microbiology*. v. 6.
- Chigusa, K.; Hasegawa, T.; Yamamoto, N.; Watanabe, Y. 1996. Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeasts. *Water Science and Technology*, v. 34, n. 11, p. 51–58.
- Cohen, J.M., SAMOCHA, T.M., FOX, J.M., GANDY, R.L., LAWRENCE, A.L. 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacult. Eng.*, 32: 425–442.
- Colt, J. 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacult. Eng.*, 34: 143–156.
- Crab R., Avnimelech Y., Defroit T., Bossier P., Verstraete W. (2007) Nitrogen removal techniques in aquaculture for sustainable production. *Aquaculture* In press.
- Dhar, R., Gesser, C., Weikert, J., Yuan., Wagner, A. 2011. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to saline stress through laboratory evolution. *Journal of Evolutionary Biology* 24, 1135–1153.
- Davies, C. M.; Bavor, H. J. 2000. The fate of stormwater-associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, n. 2, p. 349–360.
- De Schryver, P., Crab, T., Defroidt, N., Boon, W. V., 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137.

- Diver, S. 2001. 'Nature Farming and Effective Microorganisms', Rhizosphere II: Publications, Resource Lists and Web Links from Steve Diver.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 257, 346–358.
- Fell, J.W., Ahearn SP, Meyers SP, Roth FJ Jr. 1960. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida, and adjacent benthic areas. *Limnol Oceanogr* 5: 366–371.
- Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W., 2012. The Effect of Solids Removal on Water Quality, Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System. *Int. J. Rec. Aquac.* Article in press.
- Garcia, M., J., Rios, G., Rashid A., Belles, J. M., Serrano, R. 1997. Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* (143), 1125-1131.
- Genbank [site institucional]. Disponível em: <[HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)>. Acesso em: 10 jun. 2017
- Goto, S., Yamasato, K.; Okuno, D., Lizuka, H. 1972. Yeasts from the Pacific ocean. *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today*.
- Grasshoff, K. M., M. Ehrhardt, et al., 1983. Eds. *Methods of sea water analysis*. Weinheim: Verlag. Chemie, p.417, 2 nd ed.
- Head I. 1998. Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology* 144, 599-408.
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 34, 344–363.
- Hari, B., Kurup. B.M., Varghese, J.T., Schrama, J.W., Verdegem, M.C.J., 2004. Effect of carbohydrate addition in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture* 241, 179–194.
- Janeo, R. L., Corre J. R., V. L., Sakata, T., 2009. Water quality and phytoplankton stability in response to application frequency of bioaugmentation agent in shrimp ponds. *Aquac. Eng.* 40, 120–125.
- Jiang, Y., Cai, X. F., au - Wu, D.; WU D FAU - REN, N.; REN, N. Biodegradation of phenol and m-cresol by mutated *Candida tropicalis*. n. 1001-0742 (Print), 2010.
- Jiao, Y., Zhao, Q., Jin., W., Hao, X., You, S., 2011. Bioaugmentation of a biological contact oxidation ditch with indigenous nitrifying

- bacteria for in situ remediation of nitrogen-rich stream water. *Biosecure Technology*, v. 102, n. 2, p. 990-995.
- Kandasamy, K., Alikunhi, N. B., 2012. Subramanian, M. Yeasts in marine and estuarine environments. *Journal of Yeasts and Fungal Research* vol. 3(6), pp. 74-82.
- Karunasagar, I.; Pai, R.; Malathi, G.R. et al. Mass mortality *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, v.128, p. 203-209, 1994.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T.(2011a).“Definition, classification and nomenclature of the yeasts,” in *The Yeasts a Taxonomic Study* 5th Edn, eds C.P. Kurtzman, J.W. Fell and T. Boekhout (Amsterdam: Elsevier Science), 3–9.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., (2011b). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Kurtzman, C. P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V. (2011c). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW & Boekhout T (eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th edn. Elsevier. pp. 87-110.
- Kutty, S. N., Philip, R. 2008. Marine yeasts – a review. *Wiley InterScience* 25: 465-483.
- Krummenauer, D. et al. Superintensive Culture of White Shrimp. *Litopenaeus vannamei*, in *Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 42, n. 5, p. 726-733, 2011.
- Krummenauer, D.; Seifert, C.A.; Poersch, L.H.; et al. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água. *Atlântica*,v. 34, p. 103-111, 2012.
- Leaño, E.M., Mohan, C.V., 2012. Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp. *Glob. Aquac. Advocate* 4, 38–39.
- Lahav R, Fareleira P, Nejdat A, Abielovich A. 2002. The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from chemical wastewater evaporation ponds. *Microb. Ecol.* 43:388–396.
- Lee, S.S. et al. Rapid determination of yeast viability. In: *Biotechnology bioengineering symposium*, 2981, United States. *Proceedings...* United States: University of Michigan, 1981. N.11, p.641-649.
- Lin, Y-C, Chen, J-C., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259,109-119.

- Lin, Y-C, Chen, J-C., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 224,193-201.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P., 2010. *Microbiologia de Brock*. 12ª edição. ARTMED.
- Medeiros, A.O., Kohler, L.M., Hamdan, J.S., Missagia, B.S., Barbosa, F.A.R., & Rosa, C.A. 2008. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Research*, 42(14): 3921-3929
- Meyers, S.P., Ahearn, D.G Implications of yeasts and yeast-like fungi in marine processes. Veroff. Inst. Meeresforsch Bremerhaven, Suppl., v.5, p. 321-328, 1974.
- Moriarty D.J.W. 1998 Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351–358;
- Moss, S. M., Moss, D. R., Arce, S. M., Lightner, D. V., Lotz, J. M. 2012. The role of selective breeding and biosecurity in prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. *J. Invertebr. Pathol.* 110: 247–250.
- Mcabee B.J., Browdy, C.L., Rhodes, R.J., Stokes, A.D., 2003. The use of greenhouse-enclosed raceway systems for the super-intensive production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the United States. *Global Aquac. Advocate* 6, 40-43.
- McIntosh, P.R., 2000. Changing paradigms in shrimp farming: IV. Low protein feeds and feeding strategies. *Global Aquaculture Advocate* 3, 44–50.
- NewaJ-Fyzul, A., Al-Harbi, A. Andaustin, B. 2014. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture* 431, 1–11.
- Panjaitan, P. 2010. Shrimp culture of *Penaeus monodon* with zero water exchange model (swem) using molasses. *Journal of Coastal Development* 14, 35-44.
- Papon, N., Savini, V., Lanoue, A., Simkin, A.J., Crèche, J., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre, M., Courdavault, V., & Sibirny, A.A. (2013). *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Current Genetics*, 59(3): 73-90.
- Piérrri, V. Efeito da alcalinidade sobre o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Aquicultura), Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2012.

- Rajpert, L.; Sklodowska, A.; Matlakowska, R. Biotransformation of copper from Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* LM9. *Chemosphere*, v. 91, n. 9, p. 1257-65, May 2013.
- Ray, A.J., Lewis, B.L., Browdy, C.L., Leffler, J.W., 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minialexchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299, 89-98.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., Leão, C. 2006. "Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism," in *The Yeast Handbook*, eds. G. Péter and C. Rosa (Berlin: Springer), 101–121.
- Saitou, N. e Stevens 1897. Applications of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 25: 675-679.
- Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R.V., Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A., Brock, D.L., 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Eng.* 36, 184–191.
- Samocha, T.M., Wilkenfeld, J.S., Morris, T., Correia, E., Hanson, T., 2010. Intensive raceways without water exchange analyzed for white shrimp culture. *Global Aquac. Advocate* 14(4), 22-24.
- Samocha, T. M., Schweitzer, R., Krummenauer, D., Morris, T. C., Woodring, S., 2012. Recent Advances In Super-intensive Raceway Systems for Production of Marketable-Size *Litopenaeus vannamei* Under No Water Exchange. *The Practical* 2(8),20-23, Asian Aquaculture Network, Thailand.
- Song, Y.L., Lee, S.P., 1983. Characterization and ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Bull. Inst. Zool.* 3, 217–220.
- Schulze, A. D., Alabi, A. O., Tattersall-Sheldrake, A. R., , K. M., 2006. Bacterial diversity in a marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture* 256, 50–73.
- Schweitzer, R., Arantes, R., Costodio, P.F.S., Santo, C.M.D., Arana, L.V., Seiffert, W.Q., Andreatta, E.R., 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquac. Eng.* 56, 59-70.

- Stentiford, G.D., 2012. Diseases in aquatic crustaceans: problems and solutions for global food security. *J. Invertebr. Pathol.* 110: 139–276.
- Strickland, J.D., Parsons, T.R., 1984. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Second ed. Minister of Supply and Services. Ottawa.
- Tallamy, CJ e SM moss. 2006. Varied microbes important to recirculating aquaculture systems. *The Advocate*, June: 38-39.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thomas, T., Blomberg, L., Gustafsson, L., Blomberg, A. 1999. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 7764 Isolated From Rainbow Trout Intestine. *System. Appl. Microbial.* 22,145-155.
- Van Rijn, J., TAL, Y., Schreier, H. J.2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering*, p. 364-376.
- Van Wyk P. e Scarpa J. 1999. Water Quality and Management. In: Van Wyk, P., et al. (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 128–138.
- Van Wyk P. 2006 Production of *Litopenaeus vannamei* in recirculating aquaculture systems: Management and design considerations. In: *Proceedings o the 6th International conference Recirculating Aquaculture*. p. 38-47 Virginia Tech University, Blacksburg.
- Watson, T., G. 1970. Effects of Sodium Chloride on Steady-state Growth and Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* (1970), 64,91-99.
- Yang, Q., Yang, M. F., Pritsch, K., Pritsch, K. F., Yediler, A., Schlöter, M. F. 2003. A. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. n. 0141-5492.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP & Fell JW (eds) *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, 418 Amsterdam, pp 77-100.
- You, J.L., Cao, L.X., Liu, G.F., Zhou, S.N., Tan, H.M., Lin, Y.C. 2005. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (21): 679–682.

- Zars, J.H., 1984. Biostatistical analysis. Second ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Zinjarde, S. S.; Pant, A. A. 2002. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. n. 0025-326.
- Zheng, Z.H., Zeng, W., Huang, Y.J., Yang, Z.Y., Li, J. & Cai, H.R. Su, W.J. 2000 Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. FEMS Microbiology Letters 188, 87–91.
- Zhou, et al., 2009. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. Bioresource Technology. v.100. p.3780–3786..

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. John Wiley and Sons: New York, 1961. 472 p.

ANAND, P.S.S. et al. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. 2014. 418–419, 108–115 p.

ANTONY, S.P.; PHILIP, R., **Bioremediation in Shrimp Culture Systems**. NAGA, World Fish Center Quarterly, v. 29, n. 3, 2006.

ARANTES, R. F. **O efeito da relação carbono-nitrogênio sobre a comunidade microbiana no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação**. 2017. 39 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

ASADUZZAMAN, M. et al. Effect of C/N ratio and substrate addition on natural food communities in freshwater prawn monoculture ponds. **Aquaculture**. 306, 2010. 127–136 p.

AVNIMELECH, Y.; MOKADY, S.; SCHORODER, G.L., Circulated ponds as efficient bioreactors for single cell protein production. Isr. **J. Aquac.-Bamidgeh**. 41, 1989. 58–66 p.

AVNIMELECH, Y. Carbon: nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**. 176, 1999. 227–235 p.

_____. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. **Aquacult. Eng.** 34, 2006. 172–178 p.

_____. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. **Aquaculture**. 264, 2007. 140–147 p.

_____. Biofloc technology: A practical guide book. . Baton Rouge, Louisiana - United States, **The World Aquaculture Society**. 2009, 182 p.

_____. Tilapia Production Using Biofloc Technology: Saving Water, Waste Recycling Improves Economics. **Global Aquaculture Advocate**, May/Jun, 2011, p. 66–68.

AZIM, M. E.; LITTLE, D. C.; BRON, J. E., Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology*, 99, 9, 2008. 3590-3599 p.

BARDACH, J.E.; RYTHER, J.H.; MCLARNEY, W.O. Aquaculture: the farming and husbandry of fresh water and marine organisms. New York, **Wiley-Interscience.**, 1972, 868 p.

BOOPATHY, R.; FONTENOT, Q.; KILGEN, M. Biological treatment of sludge from a recirculating aquaculture system using a sequencing batch reactor. *Journal of the World Aquaculture Society* 36, 2005. 542–545 p.

BOYD, C.E., **Water Quality in Ponds for Aquaculture**. Shrimp Mart (Thai): Songkhla, Thailand. 1996. 482 p.

BROWDY, C.L. et al. Perspectives on the application of closedshrimp culture systems. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, USA, 2001. 20–34 p.

BRUNE, D.E. et al. Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic systems. *Aquacultural Engineering*, v. 28, 2003. p. 65–86.

BURFORD M. A. et al. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*. 219, 2003. 393–411 p.

BURFORD, M.A.; LORENZEN, K. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediments remineralization. *Aquaculture*. 229, 1–4, 2004. 129–145 p.

CARVALHO, R.A.P.L.F **Desenvolvimento de um sistema de recirculação para estudos de digestibilidade em condições de alto desempenho para camarões marinhos: avaliação de ingredientes protéicos alternativos à farinha de peixe em diferentes níveis de inclusão à dieta para juvenis de *Litopenaeus vannamei***. 2011. Tese

(Doutorado de Oceanografia Biológica). São Paulo, Universidade de São Paulo, 2011.

CASTIGNETTI D., GUNNER, H.B. Nitrite and nitrate synthesis from pyruvic-oxime by an *Alcaligenes sp.* **Current Microbiology**. V.5, 1981. p. 379-384.

CHIGUSA, K. et al. Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeasts. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 11, 1996. 51-58 p.

COHEN, J. M., et al. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. **Aquacult. Eng.** 32, 2005. 425–442 p.

COSTA, E. F., SAMPAIO. Y. Geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva do camarão marinho cultivado. **Revista Economia Aplicada**, v. 8 n. 2, 2004. p. 1-19.

COSTA, A. C. **Pesquisa de vibrio no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do ceará**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais). Fortaleza, UFCE, 2006. 18 p.

CRAB R. et al. Nitrogen removal techniques in aquaculture for sustainable production. **Aquaculture** In press. 2007.

DEAK, T. Environmental factors influencing yeasts, in Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. eds G. Péter and C. Rosa. **Berlin: Springer**, 2006. 155–174 p.

DEL GIORGIO P.A.; COLE J.J. Bacterial energetics and growth efficiency In: **Microbial Ecology of the oceans**. Willey-Liss: USA, 2000. 289-325 p.

DIVER, S. Nature Farming and Effective Microorganisms. Rhizosphere II: Publications, Resource Lists and Web Links from Steve Diver. 2001. EBELING, J. M., TIMMONS, M. B., BISOGNI, J. J., Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and

heterotrophic removal of ammonia: nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, 257, 2006. 346-358 p.

EMERENCIANO, M., GAXIOLA, G., CUZON, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. MIODRAG DARKO MATOVIC (Ed.). 2013. p. 448

FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations. The state of world fisheries and aquaculture. Roma: **Sofia**, 2012. 230 p.

_____. The state of world fisheries and aquaculture. Roma: **Sofia**, 2014.

_____. The state of world fisheries and aquaculture 2016. Roma, **Sofia**, 2016. 200 p.

FAO-FISHSTAT. **Fisheries Data Statistical Reporting Software**. 2015.

FERREIRA, G. S., et al., Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 448, p. 273-279. 2015.

GAO, L. et al. Effects of carbohydrate addition on *Litopenaeus vannamei* intensive culture in a zero-water exchange system. **Aquaculture**, 342–343, 2012. 89–96 p.

GERARDI, M., H., Wastewater Bioaugmentation and Biostimulation. Destech Pubns Inc. 2015. p. 147.

GIBSON, L. F., WOODWORTH J., GEORGE, A. Probiotic activity of *Aeromonas media* on a Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. **Aquaculture**, 169, 1998. 111-120 p.

GOLDMAN, E. *Practical Handbook of Microbiology*, 2 nd Ed n, eds. E. Goldman and L. Green (CRC Press). 2008.

GRAM, L. et al. *In vitro* antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer

protection of salmon against Furunculosis. **Aquaculture**, 199, p. 1-11. 2001.

HARGREAVES, J. A., Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. **Aquacult. Eng.** 34, 2006. 344–363 p.

HARI, B. et al. Effect of carbohydrate addition in extensive shrimp culture systems. **Aquaculture**, 241, 2004. 179–194 p.

HARI, B. et al. The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. **Aquaculture**, 252, 2006. 248–263 p.

HATOUM, R., LABRIE., S., FLISS, I., Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, article 421, 2012. p. 1-12.

HOROWITZ, S.; HOROWITZ, A. Microbial intervention in aquaculture. In: Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production System, Baton Rouge. Proceedings of Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally **Sound Aquaculture Production System**. Baton Rouge: The world Aquaculture Society, 2002. 119-131 p. 2002.

JACKSON, C. et al. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. **Aquaculture**, 218, 2003. 397-411 p.

JANEO, R. L.; CORRE J. R.; V. L., SAKATA, T. Water quality and phytoplankton stability in response to application frequency of bioaugmentation agent in shrimp ponds. **Aquac. Eng.**, 40, 2009.120–125 p.

JIANG, Y. et al. Biodegradation of phenol and m-cresol by mutated *Candida tropicalis*. n. 1001-0742, 2010.

JIAO, Y. et al. Bioaugmentation of a biological contact oxidation ditch with indigenous nitrifying bacteria for in situ remediation of nitrogen-rich stream water. **Biosecure Technology**, v. 102, n. 2, 2011. 990-995 p.

JOHNSON, E. A.; ERASUN, C. E. Yeast Biotechnology. In: KURTZMAN, C. P. et al (Ed.). The Yeasts: a Taxonomic Study. 5. **Elsevier**, v.1, 2011. p. 21-44.

JOSHI, J. et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND. **Aquaculture**, v.428, 2014. p 279-302.

KANDASAMY, K.; ALIKUNHI, N. B.; SUBRAMANIAN, M. Yeasts in marine and estuarine environments. **Journal of Yeasts and Fungal Research**, vol. 3- 6, 2012. 74-82 p.

KARUNASAGAR, I. et al. Mass mortality *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**, v.128, 1994. 203-209 p.

KENT, M.; BROWDY, C.L.; LEFFLER, J. W. Consumption and digestion of suspended microbes by juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 319, n. 3-4, 2011. 363-368 p.

KRUMMENAUER, D. et al. Superintensive Culture of White Shrimp. *Litopenaeus vannamei*, in Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 5, 2011. 726-733 p.

_____. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água. **Atlântica**, v. 34, p. 103-111, 2012.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. "Definition, classification and nomenclature of the yeasts," in The Yeasts a Taxonomic Study 5th Edn, eds C.P. Kurtzman, J.W. Fell and T. Boekhout. Amsterdam: **Elsevier Science**, 3–9. 2011a.

_____. The Yeasts: A Taxonomic Study. **Elsevier**. 2011b.

KUTTY, S. N.; PHILIP, R. Marine yeasts - a review. **Wiley InterScience**, 25, 2008. 465-483 p.

LACAZ, C.S., et al. Tratado de Micologia Médica. São Paulo: **Sarvier**, 2002.

LEAÑO, E.M.; MOHAN, C.V., Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp. **Glob. Aquac. Advocate**, 4, 2012. 38–39 p.

LIU, F.; HAN, W. Reuse strategy of wastewater in prawn nursery by microbial remediation. **Aquaculture**, 230, 2004.p. 281-296.

LIGHTNER, D. V. Biosecurity in shrimp farming: Pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 229-248, 2005.

LUCCHESI, T. **Avaliação da carcinicultura marinha no estado de São Paulo: uma análise a partir de indicadores de competitividade de cadeia produtiva**. 2003. 158 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. ARTMED, 2010.

MARTINI, A. Biodiversity and conservation of yeasts. **Biodiv.Conserv**, 1, 1992. 324-333 p.

MCABEE B.J. et al. The use of greenhouse-enclosed raceway systems for the super-intensive production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the United States. **Global Aquac. Advocate**, 6, 2003. 40-43 p.

MCINTOSH, P.R., Changing paradigms in shrimp farming: IV. Low protein feeds and feeding strategies. **Global Aquaculture Advocate**, 3, 2000. 44-50 p.

MEYERS, S.P.; AHEARN, D.G Implications of yeasts and yeast-like fungi in marine processes. Veroff. Inst. **Meeresforsch Bremerhaven, Suppl.**, v.5, 1974. 321-328 p.

MISCHKE, C. C.; ZIMBA, P. V. Plankton community responses in earthen channel catfish nursery ponds under various fertilization regimes. **Aquaculture**, v. 233, p. 219-235. 2004.

MONTOYA, R.; VELASCO, M. O papel das bactérias nas estratégias de alimentação e de manejo em sistemas de aquíicultura. **Revista da ABCC**, Recife, v. 2, n. 2, p. 22-23, agosto, 2000.

MORIARTY, D. J. W. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 151, p. 333-349, 1997.

_____. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture** 164, 351–358. 1998

MORIARTY, D. J. W.; DECAMP, O.; LAVENS, P. Probiotics in aquaculture. **AQUACulture AsiaPacific Magazine**. Sep/Oct. p. 14-16. 2005.

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A; ANDAUSTIN, B. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture** 431, 1–11. 2014.

NOOTONG, K.; PAVASANT, P.; POWTONGSOOK, S. Effects of organic carbon addition in controlling inorganic nitrogen concentrations in a Biofloc System. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, p. 339-346. 2011.

NUNES, A. J. P.; PARSONS, G. J. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. **Aquaculture**, 187, 133–151. 2000.

OLIVEIRA, S. S. et al. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método "fluorescent *in situ* hybridization" (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica**, Rio Grande, v.28, n.1. p. 33-45, 2006.

PAÉZ-OSUNA, F. The enviromental impact of shrimp aquaculture: a global perspective. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 229-231, 2001.

POERSCH, Luís et al. Perspectivas para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, jul/ago, 2006. p.1.337-1343.

POLI, C. R. et al. **Aquicultura: experiencias brasileiras**. Florianopolis: Multitarefa, 2004.

RAJPERT, L.; SKLODOWSKA, A.; MATLAKOWSKA, R. Biotransformation of copper from Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* LM9. **Chemosphere**, v. 91, n. 9, 65, May, 2013. p. 1257.

RAY, A. J. et al. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture** 299, 2010. p. 89-98.

RAY, A. J., LOTZ, J. M., Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. **Aquacult. Eng.** 63, 2014. p. 54–61.

RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. “Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism,” in The Yeast Handbook, eds. G. Péter and C. Rosa. **Berlin:Springer**, p. 101–121. 2006.

SALÊNCIA, H. R. Biorremediação: **alternativa para controle de sólidos no cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com bioflocos com troca zero de água**. 2011. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Aquicultura). Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

SAMOCHA, T. M. Intensive raceways without water exchange nalyzed for white shrimp culture. **Global Aquac. Advocate** 14-4, 2010. 22-24 p.

SAMOCHA, T. M. et al. Recent Advances In Super-intensive Raceway Systems for Production of Marketable-Size *Litopenaeus vannamei* Under No Water Exchange. The Practical 2(8),20-23, **Asian Aquaculture Network**, Thailand. 2012.

SCHRYVER, P. et al. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture**, 277, 2008. p. 125-137.

SCHULZE, A. D. et al. Bacterial diversity in a marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. **Aquaculture** 256, 2006. p. 50–73.

SHARIFF, M., et al. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. **Aquacult. Res.** 32, 2001. p. 181–187.

SILVA, K. R, **Dinâmica do nitrogênio e do fósforo no cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus***

- paulensis sem renovação de água.** 2009. Dissertação (mestrado em Aquicultura). Universidade Federal do Rio Grande (PPGAq-FURG). 2009.
- SOBRINHO, D. C. Estudo do crescimento, estabilidade física, química e termogravimétrica com rações para camarões marinho *Litopenaeus vannamei*. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba, 2011.
- SONG, Y.L., LEE, S.P., Characterization and ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Bull. Inst. Zool**, 3, 1983. 217–220 p.
- SPANGGAARD, B. The probiotic potential against Vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. **Environmental Microbiology** 3, 2001. 755-765 p.
- STENTIFORD, G.D., Diseases in aquatic crustaceans: problems and solutions for global food security. **J. Invertebr. Pathol.** 110, 2012. 139–276 p.
- TACON, A. G. J.; PHILLIPS, M. J.; BARG, U. C. Aquaculture Feeds and the Environment - the Asian Experience. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 10, p. 41-59, 1995.
- TACON, A. G. J. Feeding tomorrow's fish. **World Aquaculture**, Baton Rouge, v. 27, n. 3, p. 20-32, 1996.
- TALLAMY, CJ; SM MOSS. Varied microbes important to recirculating aquaculture systems. **The Advocate**, June, 38-39. 2006.
- TENDENCIA, E. A. et al., Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture** v. 232. p.145–152. 2004.
- TREECE, G.D., Shrimp culture. **Encyclopedia of aquaculture**, p. 805-868, 2000.
- VAN DIJKEN, J.P., SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.** 32, 1986. 199–224 p.

VAN WYK, P. Production of *Litopenaeus vannamei* in recirculating aquaculture systems: Management and design considerations. In: **Proceedings of the 6th International conference Recirculating Aquaculture**. p. 38-47 Virginia Tech University, Blacksburg. 2006

WANG, Y. Different functions of probiotics and its application in animal production. **J. Feed Nutr**, v. 3, 2006.

WASIELSKY JR, W. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial flox based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, 258, 2006. 396-403 p.



YANG, X.P. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. **Bioresource Technol**, 102. p. 854–862. 2011.

ZHENG, C. Aerobic degradation of nitrobenzene by immobilization of *Rhodotorula mucilaginosa* in polyurethane foam, n. 1873-3336, 2009.

ZHOU, et al., Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. **Bioresource Technology**. v.100. p. 3780–3786. 2009.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. A. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. n. 0025-326. 2002.

ANEXO A – Resultado da identificação molecular da levedura *M. guilliermondii*

 UNICAMP FIMQ-07 Serviço: GCG	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CPQBA Edição/Revisão: 2/4
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 1459/17 DRM		PÁGINA: 3 de 6

árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 6.0.

4. Resultados

- Fragmentos da região 26S da amostra CPQBA 1459/17 DRM-01 foi amplificado com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. Os produtos das amplificações foram submetidos ao sequenciamento usando o sistema ABI3500XL Series (Applied Biosystems).
- A sequência de DNA obtida para a amostra CPQBA 1459/17 DRM-01 está apresentada no Anexo I. Esta sequência foi analisada usando a rotina BLAST do GenBank e o banco de dados do CBS (*Centraalbureau voor Schimmeltecultures, Fungal Biodiversity Centre*).
- A árvore filogenética construída a partir da sequência da amostra CPQBA 1459/17 DRM-01 e das sequências recuperadas no GenBank está apresentada na Figura 1.
- O resultado da identificação está apresentado abaixo:

Amostra	Descrição da amostra	Identificação
CPQBA 1459/17 DRM-01	N2 Nádila 11.01.17	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki (2010)

3. Comentários

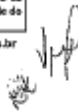
- A sequência parcial da região D1/D2 do DNAr 26S do isolado CPQBA 1459/17 DRM – 01 apresentou 100% de similaridade com as sequências da mesma região do operon ribossomal de linhagens da espécie *Meyerozyma guilliermondii*, depositadas no banco de dados GenBank e CBS.
- O resultado derivado da análise filogenética (Figura 01) revelou um agrupamento robusto entre a amostra CPQBA 1459/17 DRM – 01 e a linhagem Tipo de *Meyerozyma guilliermondii* CBS 2030 (U45709), permitindo sua identificação como *Meyerozyma guilliermondii* (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki (2010).

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de coleta e produção analisadas, sendo vedado sua utilização para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a corporação. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade de qualquer natureza ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2859

FAX: (19) 2139 3853

e-mail: cnpqba@cpqba.unicamp.br



APÊNDICE - A



a) Unidades experimentais de 60 L utilizadas no ensaio de formação e manutenção de flocos microbianos quando suplementado com a levedura *M. guilliermondii* na água de cultivo de *L. vannamei*. Cada tratamento foi realizado em quaduplicata.



b) Cone “Inhoff” com amostra da água de cultivo superintensivo em sistema de bioflocos de cada uma das unidades experimentais.



c) Camarão marinho no início e ao final dos 30 dias de ensaio experimental avaliando a formação e manutenção do sistema de bioflocos quando suplementada a levedura *M. guilliermondii* na água de cultivo de *L. vannamei*.